

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Elaboration d'un système d'expression conditionnelle de Magea1 (Cre/lox) dans des cellules souches embryonnaires de souris

Depauw, Aurélie

*Award date:*  
2006

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**

**FACULTE DES SCIENCES**

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20.

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Elaboration d'un système d'expression conditionnelle de *MAGEA1* (Cre-lox)  
dans des cellules souches embryonnaires**

DEPAUW Aurélie

Résumé

Le génome des mammifères contient plusieurs dizaines de gènes *MAGE*. Ces gènes ont été classés en deux grandes catégories sur base de leur profil d'expression. Les gènes *MAGE* de type I sont exprimés dans une portion variable de tumeurs de divers types histologiques ainsi que dans les testicules et parfois dans les ovaires et le placenta, mais sont complètement silencieux dans tous les autres tissus adultes. Leur expression peut conduire à l'apparition de peptides antigéniques présentés à la surface des cellules tumorales par les molécules HLA et reconnus par des lymphocytes T cytolytiques. Les gènes *MAGE* de type II sont exprimés dans de nombreux tissus somatiques normaux au cours du développement et chez l'adulte. L'expression dans les tumeurs du gène de type I *MAGEA1* est causée par des événements de déméthylation du génome qui se produisent au cours du processus de transformation tumorale. L'expression de *MAGEA1* dans les tumeurs pourrait n'être qu'un épiphénomène, mais elle pourrait aussi contribuer au processus de transformation. Une façon de tester cette hypothèse est de créer une souris transgénique exprimant *MAGEA1* et d'évaluer le développement de tumeurs chez ces animaux. Ce travail s'inscrit dans un projet de développement d'une lignée de souris exprimant *MAGEA1* de manière conditionnelle. Le croisement de cette lignée avec différentes lignées de souris transgéniques Cre devrait permettre l'expression de *MAGEA1* dans divers tissus dans lesquels nous observerons le développement éventuel de tumeurs. Indépendamment de cette hypothèse, le modèle que nous développons permettra d'évaluer in vivo les conséquences de l'expression de *MAGEA1* dont la fonction est toujours mal définie. Au cours de ce travail, nous avons créé un vecteur d'expression conditionnelle de *MAGEA1* activable par le système Cre/lox et avons introduit ce vecteur dans des cellules souches embryonnaires.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2006

**Promoteur:** O. De Backer

## **Liste des abréviations**

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Ap <sup>r</sup>	Résistant à l'ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
Bp	Base pair
CIP	Phosphatase alcaline intestinale de veau
CM	Milieu complet
CTL	Lymphocytes T cytolytiques
dATP	Déoxyadénosine triphosphate
dCTP	Déoxycytosine triphosphate
dGTP	Déoxyguanosine triphosphate
dNTP	Déoxynucléotide triphosphate
dUTP	Déoxyuracile triphosphate
dTTP	Déoxythymidine triphosphate
DS	Double strand (double brin)
DTA	Toxine diphtérique
EDTA	Ethylenedinitrotetraacetic acid
Cdk	Cyclin-dependent kinase
Cellule ES	Cellule souche embryonnaire (embryonic stem cell)
Dlxin	Dlx interacting protein
DO	Densité optique
DMEM	Dulbecco's modified eagle media
DMSO	Diméthylsulfoxyde
E. coli	Escherichia coli
F	Faraday
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal Calf serum (sérum de veau fœtal)
G418	Généticine
GMEM	Glasgow Modified Eagle Medium
H <sub>2</sub> O	eau
HAT	Histone déacétyltransférase
HCl	Acide chlorhydrique
HDAC	Histone déacétylase
HLA	Human leukocyte antigen
JNK	c-jun N-terminal kinase
KAc	Acétate de potassium
Kan <sup>R</sup>	Résistance à la kanamycine
Kan <sup>S</sup>	Sensibilité à la kanamycine
Kb	Kilo base
kD	Kilo Dalton
KO	Knock out
LB	Luria Bertani
LBA	LB + ampicilline
LIF	Leukemia Inhibitor Factor
LHRH	Lutenizing Hormone-Releasing Hormone
LoxP	Locus of X-over of P1
MAGE	Protéine MAGE humaine
<i>MAGE</i>	Gène MAGE humain
<i>Mage</i>	Gène Mage murin

MAGE	Melanoma AntiGen
Mage	Protéine Mage murine
MCS	Site multiple de clonage
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MEL	Melanome
min	minute
MHC-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
MHD	Mage homology domain
MM	Masse molaire
MMC	mytomicine
ms	milliseconde
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
Neo <sup>r</sup>	Résistance à la neomycine
NK- <sub>B</sub>	Nuclear factor-kappa B
NRAGE	Neurotrophin receptor-interacting mage homolog
NTR	Neurotrophine
O/N	Over night
p75 <sup>NTR</sup>	p75 neurotrophin receptor
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pgk	Phosphoglucokinase
PM	Poids moléculaire
PWS	Syndrôme de Prader-Willi
Rb	Retinoblastoma protein
rpm	Rotation par minute
RT	Room Temperature
SDS	Sodium lauryl sulfate ou sodium dodecyl sulfate
SKIP	Ski interacting Protein
SSC	Standard saline citrate
T75	Boîte de culture cellulaire de 75 cm <sup>2</sup>
TAE	Tris acétate EDTA
TCR	Récepteur de lymphocyte T cytolytique
TE	Tris EDTA
TNF	Tumor necrosis factor
TpA	Stop transcriptionnel
Trk	Récepteur tyrosine kinase
TVP	Trypsine –EDTA pour cellules souche
V	Volt
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

<a href="#"><u>Introduction</u></a>	6
<a href="#"><u>I. La famille des gènes <i>MAGE</i></u></a>	7
<a href="#"><u>I.1. Découverte des gènes <i>MAGE</i></u></a>	7
<a href="#"><u>I.1.1. <i>MAGEA1</i>, un gène codant un antigène spécifique de tumeurs humaines</u></a>	7
<a href="#"><u>I.1.2. Définition moléculaire de l'antigène MZ2-E</u></a>	7
<a href="#"><u>I.2. Classification des gènes <i>MAGE</i></u></a>	9
<a href="#"><u>I.2.1. Les gènes <i>MAGE</i> de type I</u></a>	9
<a href="#"><u><i>I.2.1.1. Les gènes <i>MAGEA</i></i></u></a>	11
<a href="#"><u><i>I.2.1.2. Les gènes <i>MAGEB</i></i></u></a>	14
<a href="#"><u>I.2.2. Les gènes <i>MAGE</i> de type II</u></a>	15
<a href="#"><u><i>I.2.2.1. Le gène <i>NECDIN</i></i></u></a>	15
<a href="#"><u><i>I.2.2.2. Les gènes <i>MAGED</i></i></u></a>	16
<a href="#"><u>II. La mutagenèse dirigée dans les cellules souches</u></a>	20
<a href="#"><u>II.1. Propriétés et intérêt des cellules souches embryonnaires</u></a>	20
<a href="#"><u>II.1.1. L'obtention de cellules souches embryonnaires</u></a>	20
<a href="#"><u>II.1.2. Propriétés des cellules ES</u></a>	21
<a href="#"><u>II.1.3. L'utilisation des cellules ES pour la construction de chimères</u></a>	21
<a href="#"><u>II.2. Elaboration de souris modèles par recombinaison homologue</u></a>	21
<a href="#"><u>II.2.1. La recombinaison homologue</u></a>	21
<a href="#"><u>II.2.2. Méthode d'introduction d'un fragment d'ADN exogène dans les cellules en culture</u></a>	22
<a href="#"><u>III. La mutagenèse conditionnelle utilisant le système Cre/loxP</u></a>	22
<a href="#"><u>III.1. Le système Cre/loxP</u></a>	22
<a href="#"><u>III.2. Application du système Cre/LoxP chez la souris</u></a>	24
<a href="#"><u>III.2.1. Stratégie d'utilisation du système Cre/LoxP chez la souris</u></a>	24
<a href="#"><u><i>III.2.1.1. Les Knock-out conditionnels</i></u></a>	24
<a href="#"><u><i>III.2.1.2 L'expression conditionnelle</i></u></a>	26
<a href="#"><u>III.2.2. Cre ER : une recombinase inductible par le tamoxifène</u></a>	26
<a href="#"><u>V. Objectif du mémoire</u></a>	27
<a href="#"><u>Matériels et méthodes</u></a>	28
<a href="#"><u>I. Matériel</u></a>	29
<a href="#"><u>I.1. Plasmides</u></a>	29
<a href="#"><u>I.2. Oligonucléotides</u></a>	30
<a href="#"><u>II. Méthodes</u></a>	30
<a href="#"><u>II.1. Techniques relatives à l'utilisation d'ADN</u></a>	30
<a href="#"><u>II. 1.1 Transformation d'<i>Escherichia coli</i> par choc électrique</u></a>	30
<a href="#"><u>II.1.2. Culture de bactéries</u></a>	30
<a href="#"><u>II.1.3. Préparation d'ADN plasmide par lyse alcaline</u></a>	31
<a href="#"><u>II.1.4. Electrophorèse en gel d'agarose</u></a>	31
<a href="#"><u><i>II.1.4.1. Les échantillons</i></u></a>	31
<a href="#"><u><i>II.1.4.2. Marqueur de Poids Moléculaire pour ADN</i></u></a>	31
<a href="#"><u><i>II. 1.4.3. Préparation du gel</i></u></a>	31
<a href="#"><u>II.1.5. Restrictions sur plasmide</u></a>	32
<a href="#"><u>II.1.6. Déphosphorylation d'un plasmide linéarisé</u></a>	32
<a href="#"><u>II.1.7. Remplir les extrémités cohésives d'un plasmide linéarisé pour les rendre franches</u></a>	32
<a href="#"><u>II.1.8. Ligation d'un plasmide</u></a>	32
<a href="#"><u>II.1.9. Purification de l'ADN sur colonne (Kit Promega Wizzard® SV Gel and PCR Clean-Up System)</u></a>	33
<a href="#"><u><i>II.1.9.1. Purification d'ADN à partir du gel d'agarose</i></u></a>	33
<a href="#"><u><i>II.1.9.2. Purification de l'ADN</i></u></a>	33

II.1.10. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	33
II.1.11. Criblage par hybridation d'une sonde radioactive.....	34
II.1.11.1. Préparation des membranes pour l'hybridation .....	34
II.1.11.2. Préparation de la sonde radioactive et hybridation .....	34
II.1.12. Test de recombinaison des sites LoxP .....	36
II.1.12.1. Production de bactéries compétentes Cre.....	36
II.1.12.2. Transformation de bactéries compétentes Cre par pROSA26Neo-A1.....	36
II. Techniques sur cellules souches embryonnaires.....	36
II.2. Culture de cellules souches.....	36
II.2.1. Préparation de la couche nourricière (feeder layer).....	36
II.2.2. Cultures de cellules ES sur MEFs .....	36
II.3. Electroporation .....	37
II.3.1. ADN.....	37
II.3.2. Les cellules souches.....	37
II.3.3. Electroporation .....	38
II.3.4. Sélection à la généticine.....	38
II.4. Culture des cellules sélectionnées sur plaque 96 puits.....	38
II.4.1. Culture des colonies de cellules ES sur plaque 96 puits.....	38
II.4.2. Procédure de congélation .....	38
II.4.3. Isolation de l'ADN .....	39
Résultats et discussion.....	40
I Stratégie élaborée afin de générer des souris exprimant <i>MAGEA1</i> de manière conditionnelle	41
II. Résultats .....	4
II.1. Insertion de <i>MAGEA1</i> en aval d'une cassette « Neo floxée » formant un terminateur de transcription conditionnel .....	4
II.1.1. Construction du vecteur pBigTA1 .....	4
II.2. Insertion de la cassette « floxed-NeopA-A1 » entre les deux bras d'homologie de pROSA26PA .....	7
II.3. Test de recombinaison des sites LoxP.....	9
II.4. Obtention de cellules ES exprimant <i>MAGEA1</i> de manière conditionnelle .....	10
II.4.1. Transformation des cellules ES .....	10
III. Discussion et perspectives.....	13
Bibliographie .....	15



# Introduction



# **I. La famille des gènes *MAGE***

## **I.1. Découverte des gènes *MAGE***

### **I.1.1. MAGEA1, un gène codant un antigène spécifique de tumeurs humaines**

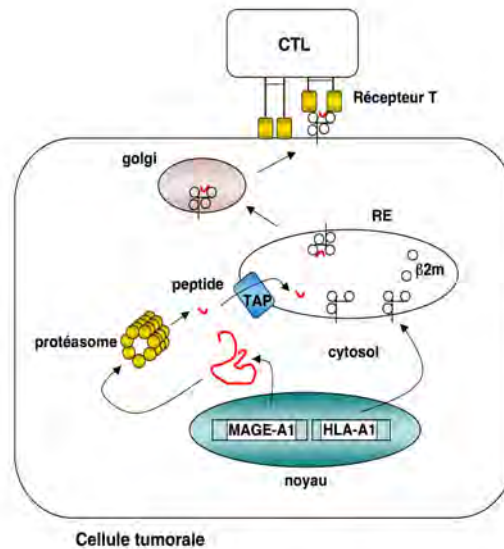
En 1957, il est montré que les cellules de nombreuses tumeurs, induites *in vitro* par des carcinogènes chimiques ou physiques, portent en surface des antigènes capables de provoquer une réponse de rejet. En 1991, la saga des gènes *MAGE* débutait. A cette époque, les recherches, développées par l'équipe du professeur Thierry Boon de l'Institut Ludwig de Bruxelles, s'inscrivent dans le cadre de l'immunothérapie anti-cancéreuse. Ils établissent une méthode permettant d'identifier des gènes spécifiant des antigènes tumoraux en se basant sur la reconnaissance spécifique des tumeurs par les CTLs (Lymphocytes T cytolytiques). La présence d'antigènes spécifiques à la surface de tumeurs humaines est aujourd'hui établie grâce à leur reconnaissance par des clones de lymphocytes T cytolytiques (CTL). Afin d'isoler de tels lymphocytes, les cellules de la lignée de mélanome MZ2-MEL du patient MZ2 furent cultivées en présence de lymphocytes du sang de ce patient. L'interaction entre le récepteur (TCR) des lymphocytes et l'antigène présenté par la cellule cible tumorale stimulait la prolifération des CTLs. De cette manière, le taux de lymphocytes T dirigés de manière spécifique contre les antigènes présentés en surface des cellules, MZ2-MEL s'enrichit considérablement dans la culture mixte tumeur/lymphocytes. Lorsqu'un clone CTL donné est mis en présence de cellules MZ2-MEL, la quasi-totalité des cellules MZ2-MEL sont lysées. Toutefois, une faible fraction survit et prolifère. Cette « immunosélection » permet d'isoler des variants de perte de l'antigène. Ces variants sont toujours reconnus par d'autres clones CTL ce qui démontre l'existence de plusieurs antigènes indépendants à la surface des cellules MZ2-MEL. Parmi ceux-ci figure l'antigène MZ2-E (Van den Eynde et al., 1989). Une bibliothèque génomique contenant l'ADN des cellules MZ2-MEL fut alors construite dans le but de cloner le gène codant l'antigène MZ2-E. Le variant de perte MZ2-MEL2.2 fut transformé par transfection d'ADN de cette bibliothèque et les transfectants furent incubés en présence du clone CTL anti-MZ2-E. Les transfectants exprimant l'antigène MZ2-E ont pu être identifiés grâce à leur capacité d'activer le clone CTL anti-MZ2-E. Le gène codant pour l'antigène MZ2-E fut ainsi identifié. Ce gène, qui ne présentait aucune homologie avec les séquences contenues dans les banques de données publiques de l'époque, fut alors baptisé *MAGEA1* pour Mélanoma AntiGène (Van der Bruggen et al., 1991).

### **I.1.2. Définition moléculaire de l'antigène MZ2-E**

Les antigènes reconnus par les lymphocytes T cytolytiques, sont des peptides environ 10 acides aminés formés suite à la dégradation de protéines cytoplasmiques par le protéasome (Figure 1). Ces peptides sont présentés à la surface des cellules par les domaines extracellulaires du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I). (Rotzschke et al., 1990). Des transporteurs TAP conduisent ces peptides vers le réticulum endoplasmique où ils s'associent aux complexes MHC-I formés par une molécule HLA de type I et la  $\beta_2$ -microglobuline. Ce complexe est alors transporté à la surface de la cellule où il pourra être reconnu par le récepteur TCR d'un CTL. La présentation de ces peptides en surface ne déclenche normalement pas de réponse aux peptides du « soi ». Par contre, si la cellule est infectée par un virus, des peptides viraux pourront être reconnus par des CTL. De la même

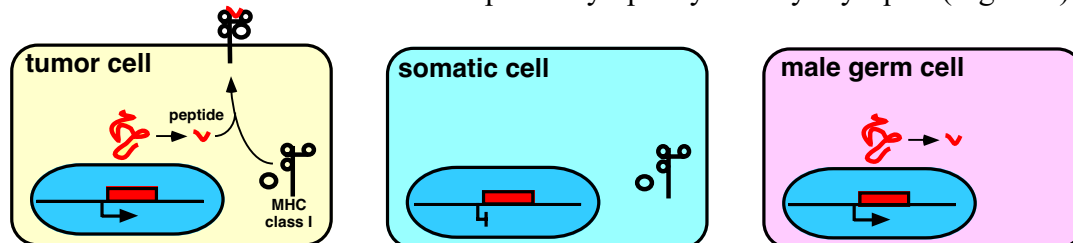


manière, une réponse immunitaire peut être déclenchée si une cellule cancéreuse exprime une protéine qui n'est pas présente dans les tissus normaux. L'antigène MZ2-E est un peptide de 9 acides aminés de la protéine MAGEA1 qui est présenté par les molécules HLA-A1 (Traversari et al., 1992 ).



**Figure 1 :** Mécanisme de présentation d'un antigène à un lymphocyte T cytotoxique par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (d'après la thèse de Mathieu Bertrand)

MAGEA1 est silencieux dans les tissus adultes normaux, à l'exception des cellules de la lignée germinale mâle. Il est cependant exprimé dans une fraction variable de tumeurs de différents types histologiques. Son expression dans les tumeurs peut conduire à l'apparition de peptides antigéniques présentés par les molécules HLA (Human Leukocyte Antigen) de classe I à la surface des cellules et reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (Figure 2).

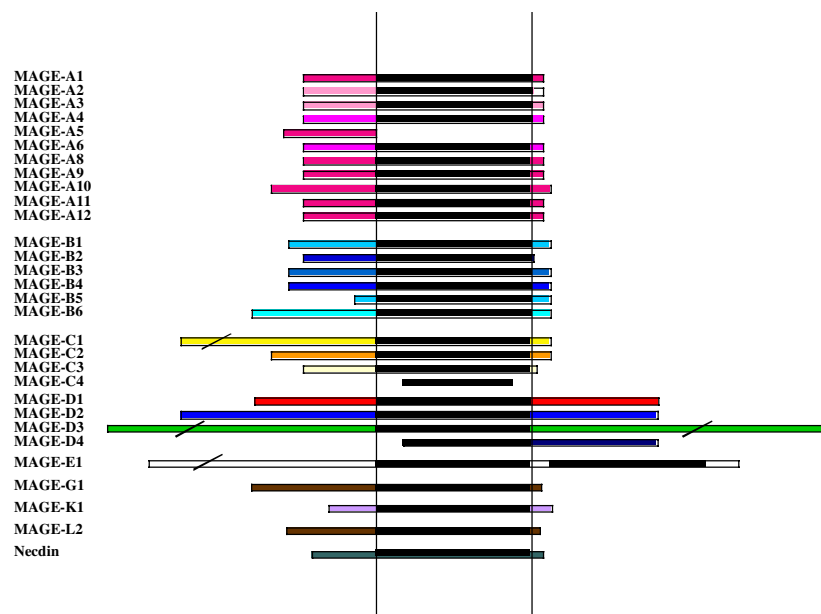


**Figure 2 :** Représentation schématique de l'expression du gène MAGEA1 et de l'antigène correspondant dans les cellules tumorales, somatiques et de la lignée germinale mâle (d'après le mémoire de Vanessa Héron,, 2004).

Comme les cellules de la lignée germinale mâle n'expriment pas les molécules HLA, les peptides ne sont pas présentés et les antigènes MAGE sont bien spécifiques des tumeurs. Ils sont donc particulièrement intéressants pour l'immunothérapie anti-cancéreuse : un vaccination contre ces antigènes pourrait déclencher une réaction immunitaire aboutissant à l'élimination des cellules tumorales.

## I.2. Classification des gènes MAGE

Le criblage de bibliothèques d'ADN génomique et d'ADNc avec une sonde *MAGEA1* a montré que *MAGEA1* appartient à une grande famille de gènes. Depuis l'identification du premier gène *MAGE*, la famille des gènes *MAGE* s'est largement étendue, et grâce au séquençage complet des génomes humains et de souris, 55 gènes *MAGE* humains et 30 gènes *Mage* murins ont été identifiés. Ces gènes sont classés en sous-familles sur base de leur localisation chromosomique et de leur similarité de séquence. On compte 13 sous-familles de gènes *MAGE* chez l'homme et 9 chez la souris (Chomez et al., 2001). Les protéines de la famille MAGE partagent toutes une région d'environ 200 acides aminés appelée « MAGE homology domain » (MHD). Il est localisé à l'extrémité COOH-terminale des protéines excepté dans les protéines MAGED où il occupe une position plus centrale (Figure 3). Ce domaine est la seule région d'homologie présente chez tous les membres de la famille, le reste de la séquence protéique variant largement d'une sous-famille à l'autre. La séquence en acides aminés des protéines MAGE ne contient aucune signature particulière évocatrice quant à la fonction de ces protéines.

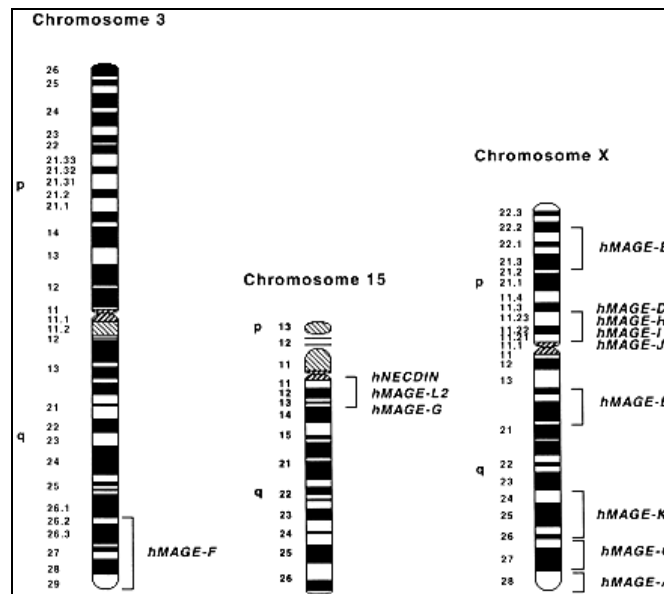


**Figure 3 :** Les protéines de la famille des gènes MAGE partagent une région d'homologie appelée « MAGE homology domain » (en noir)

Chez les mammifères, les gènes *MAGE* sont classés en deux catégories sur base de leur profil d'expression : les gènes *MAGE* de type I et de type II (Chomez et al., 2001).

### I.2.1. Les gènes MAGE de type I

Cette première catégorie comporte la majorité des gènes *MAGE*. Parmi ceux-ci, les gènes *MAGEA*, *B* et *C*. Les gènes *MAGEA* sont au nombre de 15 chez l'homme et de 9 chez la souris. Dix-sept gènes *MAGEB* ont été identifiés chez l'homme et 10 chez la souris, tandis que la sous-famille *MAGEC* comporte 7 membres chez l'humain mais n'existe pas chez la souris (Chomez et al., 2001). Les gènes MAGE de type I sont organisés en « chapelets » sur les chromosomes. Chez l'homme, ils sont localisés sur le chromosome X dans les régions p21 (*MAGEB*), q26-27 (*MAGEC*) et q28 (*MAGEA*) (Figure 4).

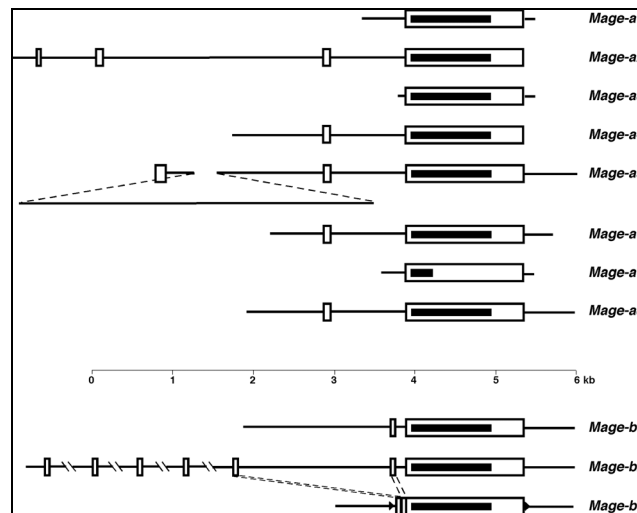


**Figure 4 :** Localisation chromosomique des sous-familles de gènes *MAGE* humains (Chomez et al., 2001).

Les gènes de type I sont exprimés dans une portion variable de tumeurs de divers types histologiques ainsi que dans les testicules et parfois dans les ovaires et le placenta, mais restent silencieux dans tous les autres tissus adultes (Chomez et al., 2001). Certains de ces gènes (comme *MAGEA1*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEC2*) codent pour des protéines qui, lorsqu'elles sont dégradées, génèrent des peptides antigéniques présentés par les molécules HLA (Human Leukocyte Antigen) de classe I à la surface des cellules et reconnus par les lymphocytes T cytolytiques (Van der Bruggen et al., 2002). Des essais cliniques à petite échelle montrent que l'immunisation de patients porteurs de mélanomes avec un peptide antigénique encodé par le gène *MAGEA3* entraîne une régression tumorale chez 10 à 20% des patients. (Marchand et al., 1999 ; Thurner et al., 1999). La fonction antigénique des protéines *MAGE* de type I reste inconnue.

Les testicules constituent les seuls organes adultes normaux où la majorité des gènes *MAGE* de type I sont exprimés. Il a été démontré par hybridation in situ que les gènes *Magea* et *b* sont exprimés dans les cellules germinales mâle. Les spermatogonies, qui sont les cellules préméiotiques, expriment plusieurs gènes *Magea* tandis que les spermatides (cellules haploïdes qui se différencient en spermatozoïdes) expriment les gènes *Mageb1*, *b2* et *b3*. Il y a donc une régulation de l'expression des gènes *Magea* et *b* lors de la spermatogenèse. Les cellules somatiques du testicule (cellules de Leydig et de Sertoli) n'expriment pas les gènes *Mage* (Clotman et al., 2000, résultats non publiés du laboratoire).

Seul le dernier exon des gènes *MAGE* de type I est codant (Figure 5).



**Figure 5 :** Structure génomique des gènes *Magea* et *Mageb* de souris. Les exons sont représentés par des boîtes. Les traits noirs épais représentent les grilles de lecture. Le gène *Mageb3* est un variant rétroposé du gène *Mageb2*.

Les gènes *MAGE* de type I sont caractérisés par une évolution rapide rendant impossible l'établissement de relations d'orthologie entre les gènes humains et murins.

#### ***1.2.1.1. Les gènes MAGEA***

Chez l'homme, la sous-famille des gènes *MAGEA* contient 15 gènes. La localisation subcellulaire des protéines *MAGEA* semble varier d'un membre à l'autre de la famille. *MAGEA1* et *MAGEA3* sont localisées dans le cytosol des cellules de mélanomes. *MAGEA1* et *MAGEA4* ont été détectés dans le cytoplasme et le noyau des spermatogonies (Takahashi et al., 1995). *MAGEA10* et *MAGEA11* sont localisés de manière prédominante dans le noyau des cellules tumorales (Rimoldi et al., 1999, Jurk et al., 1998).

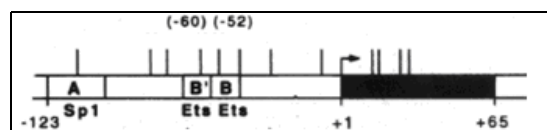
##### **1.2.1.1.1. MAGEA1**

###### ***1) Contrôle transcriptionnel du gène MAGEA1***

Chez les mammifères, les cytosines dans les séquences CpG peuvent être méthylées. Cette modification de l'ADN contribue à rendre des gènes silencieux en prévenant la liaison de facteurs de transcription activateurs et en attirant des complexes répresseurs qui induisent la formation de structures inactivant la chromatine (Bird, 2002). Le rôle répresseur de la méthylation de l'ADN a été clairement démontré dans des processus tels que l'inactivation du X dans les cellules somatiques femelles et le silençage mono allélique de gènes subissant l'empreinte parentale (Ferguson-Smith et al., 2001 ; Riggs et al., 1992). L'établissement et la maintenance de profils de méthylation spécifiques du génome sont essentiels pour l'expression appropriée de gènes dans différents types cellulaires. Des profils de méthylation de l'ADN spécifiques semblent être établis durant le développement embryonnaire par un processus qui implique une phase précoce de déméthylation suivie par une méthylation de novo (Kafri et al., 1992 ; Monk et al. 1987). Les mécanismes dirigeant la méthylation restent encore peu connus. Le statut non méthylé de certaines régions a été attribué à leur association avec des promoteurs actifs (Macleod et al., 1998). Les modèles de méthylation qui sont établis dans l'embryon sont généralement maintenus dans les cellules somatiques adultes différenciées, qui montrent des petits changements de méthylation.

Les profils de méthylation du génome sont souvent modifiés dans les cellules cancéreuses. Ces modifications incluent des méthylations de novo localisées et des déméthylations globale du génome. La méthylation de novo liée au cancer semble contribuer au processus de transformation et de progression tumorale par la répression de l'expression de gènes suppresseur de tumeurs (Baylin et al., 1998). Dans les cellules cancéreuses, l'hypométhylation de l'ADN affecte la majorité du génome, incluant les séquences répétitives et en simple copie. Il a été proposé que l'hypométhylation des cellules cancéreuses contribuait à la progression tumorale en induisant l'instabilité du génome via la déméthylation de transposons et de répétitions péri-centriques. Récemment, différentes recherches ont montré que l'hypométhylation dans les tumeurs cause l'activation de gènes multiples, incluant les gènes *MAGE*, qui sont silencieux dans les tissus normaux.

Des expériences de transfection transitoire ont indiqué que les cellules qui n'exprimaient pas le gène *MAGEA1* contenaient néanmoins des facteurs de transcription Ets et Sp1 capables d'induire l'activité du promoteur de *MAGEA1* (Figure 6) (De Smet et al., 1995). Cela impliquait que l'absence de transcription requiert un mécanisme de répression pour empêcher l'activation par ces facteurs de transcription ubiquitaires. Il a été observé que *MAGEA1* possède un promoteur riche en CpG, qui, contrairement aux promoteurs riches en CpG classiques, est méthylé dans tous les tissus somatiques normaux. Le gène, qui se situe sur le chromosome X, est méthylé non seulement sur le chromosome X inactif, mais aussi sur le chromosome X actif. Par contre, la région promotrice de *MAGEA1* est entièrement non méthylée dans les cellules germinales du testicule et dans les cellules tumorales qui expriment le gène (De Smet et al., 1999). Un traitement avec l'agent déméthylant 5-aza-2'-deoxycytidine active l'expression du gène *MAGEA1* dans les cellules tumorales mais aussi dans les cellules normales n'exprimant normalement pas ce gène (De Smet et al., 1996). Ce phénomène est aussi observé pour d'autres gènes spécifiques des tumeurs tels que *GAGE*, *BAGE*, *PIA* qui présentent le même profil d'expression que les gènes *MAGE*. (De Backer et al 1999).



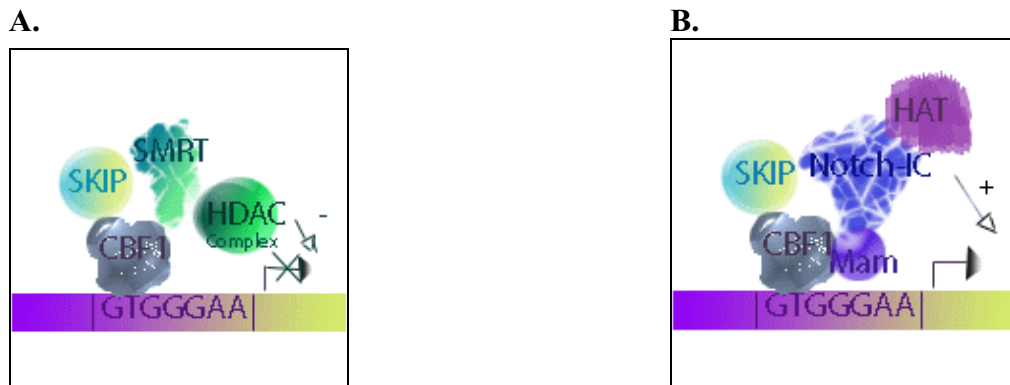
**Figure 6 :** Contenu en CpG du promoteur de *MAGEA1*. La position des dinucléotides CpG est indiquée par les barres verticales. Les sites de liaisons A (Sp1), B' et B (Ets) sont indiqués au niveau du promoteur. L'exon est représenté en noir.

Ces observations montrent que la méthylation de l'ADN est une cause essentielle de la répression de *MAGEA1* dans les cellules somatiques. Après avoir été déméthylé et induit, *MAGEA1* échapperait à la méthylation de novo grâce à l'activité de son promoteur.

## **2) *MAGEA1* interagit avec l'adaptateur *SKIP* et l'histone déacétylase *HDAC1* pour réprimer la transcription.**

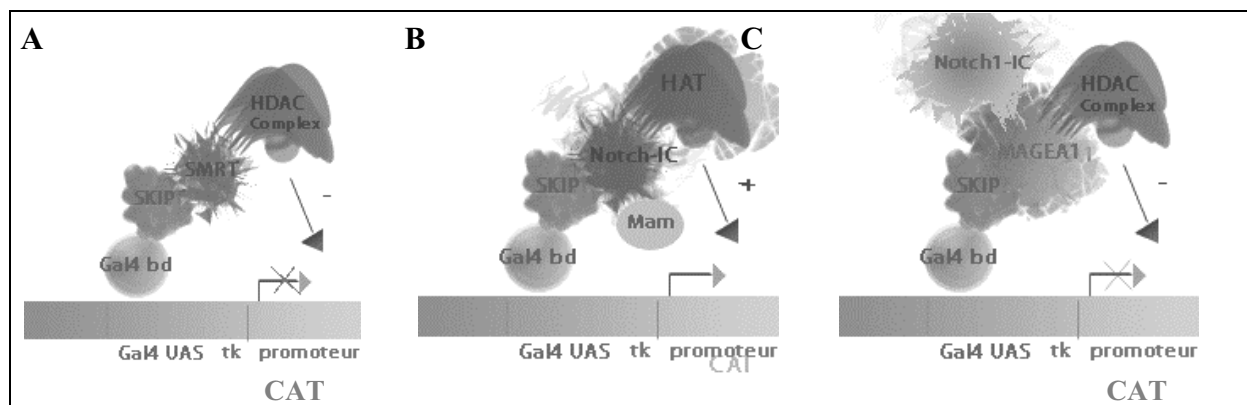
Le système double-hybride dans la levure a permis d'identifier une interaction physique entre *MAGEA1* et *SKIP* (Ski Interacting Protein). *SKIP* est une protéine adaptatrice intervenant dans la régulation de la transcription. Elle est impliquée dans la transduction du signal de Notch1, un récepteur transmembranaire capital pour les communications intercellulaires et pour les décisions concernant le destin cellulaire durant le développement. La liaison d'un ligand à Notch1 induit un clivage protéolytique intramembranaire qui libère le domaine intracellulaire du récepteur Notch1-IC. Celui-ci entre alors dans le noyau et régule

l'expression de différents gènes. Une des protéines liant l'ADN qui interagit avec Notch1-IC est CBF1 (C-promoter binding factor 1). En l'absence de Notch1-IC, CBF1 inhibe la transcription en liant SKIP et le complexe corépresseur SMRT qui contient une activité histone déacétylase HDACs (figure 7A). La répression est levée en présence de Notch1-IC qui lie SKIP et CBF1, déplace le complexe de répression et active la transcription en recrutant des histones acétyltransférases (HATs) ainsi que des coactivateurs tels que Mastermind (Mam), qui stabilisent le complexe Notch1-IC/CBF1. (Figure 7B). MAGEA1 peut interférer avec l'activité transcriptionnelle de Notch1-IC dépendant de SKIP. Une analyse de délétion indique que cette inhibition requiert la liaison de l'extrémité C-terminale de MAGEA1 à SKIP.



**Figure 7 :** Modèle d'activation du promoteur HES (Hair/Enhancer of Split) par NotchIC régulé par CBF1. (A). Le complexe corépresseur SMRT contenant HDAC lie SKIP. (B). Notch1-IC interagit avec SKIP et CBF1, déplace le complexe corépresseur SMRT et active la transcription des gènes HES via le recrutement de Mastermind (Mam) et HATs. (D'après Laduron et al., 2004)

MAGEA1 réprime activement la transcription en liant et recrutant l'histone déacétylase 1 (HDAC1). En se liant à SKIP et en recrutant HDAC1, MAGEA1 exerce une activité de répresseur transcriptionnel. MAGEA1 pourrait donc participer au contrôle de gènes impliqués dans la croissance des cellules tumorales ou la spermatogenèse (Figure 8).

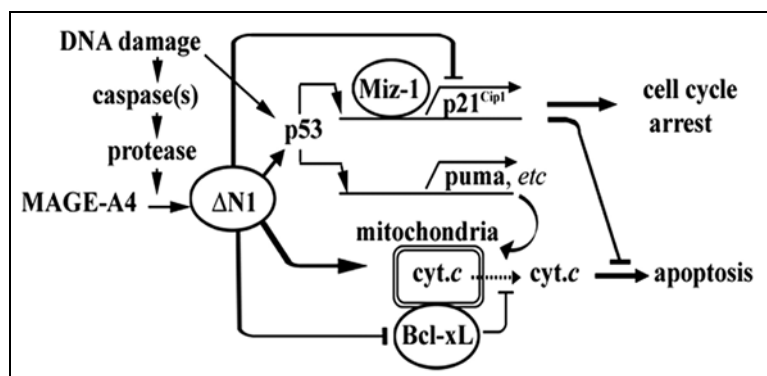


**Figure 8 :** MAGEA1 contrecarre la transactivation par Notch1-IC et recrute HDAC. (A-B) Résumé de données expérimentales utilisant Gal4bd et SKIP, Notch1-IC et le rapporteur CAT en accord avec le modèle de Zhou et al. (C) En se liant à SKIP et en recrutant HDAC, MAGEA1 contrecarre la transactivation par Notch1-IC et réprime la transcription. (D'après Laduron et al., 2004)

MAGEA4, la seule autre protéine MAGE dans laquelle cette région C-terminale est conservée, lie aussi SKIP tandis que MAGEA10 et MAGED2, qui possèdent des parties C-terminales très différentes, ne lient pas SKIP dans le système double-hybride dans la levure (Laduron et al., 2004)

### I.2.1.1.2. MAGEA4

La gankyrine, une oncoprotéine récemment découverte, est une cible prometteuse pour la thérapie médicamenteuse car elle est surexprimée dans la plupart des carcinomes hépatocellulaires. La gankyrine interagit avec la partie C-terminale de MAGEA4. La protéine MAGEA4 serait clivée pour fournir un fragment C-terminal de 107 acides aminés. Ce fragment (MAGEA4- $\Delta$ N1) induirait l'apoptose de manière dépendante et indépendante à p53 (Figure 9). En effet, MAGEA4- $\Delta$ N1 augmente le taux de p53 mais diminue la transcription de p21<sup>Cip1</sup>. Un crible double-hybride dans la levure a démontré que MAGEA4- $\Delta$ N1 est recruté par Miz-1 au niveau du promoteur p21<sup>Cip1</sup> et inhibe la transcription de p21<sup>Cip1</sup>.



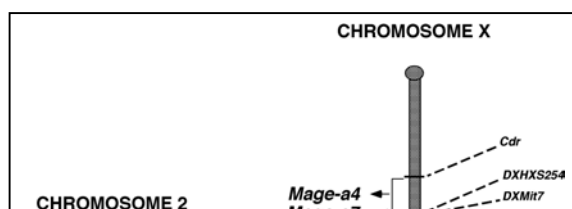
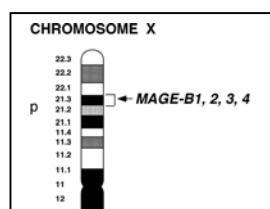
**Figure 9 :** Modèle des mécanismes de l'apoptose induite par MAGEA4  $\Delta$ N1. MAGEA4 est clivé par une activité protéase dépendant des caspases spécialement quand il est exposé à un stress génotoxique, pour générer MAGEA4  $\Delta$ N1 qui inhibe la transcription de p21<sup>CIP1</sup> en liant Miz-1 et augmente le taux de protéines p53 conduisant à l'induction de gènes proapoptotiques. De plus, MAGEA4  $\Delta$ N1 diminue le taux de protéines Bcl-xL. Tous ces effets contribuent à la mort cellulaire.

L'activité pro-apoptotique de l'extrémité C-terminale d'autres protéines de la famille MAGEA, structurellement similaires à MAGEA4, a été étudiée. Les extrémités C-terminales de MAGEA1, A2 et A12 augmenteraient elles aussi l'apoptose, mais moins activement que MAGEA4- $\Delta$ N1 (Sakurai et al., 2004).

### I.2.1.2. Les gènes MAGEB

Dix-sept gènes *MAGEB* ont été identifiés chez l'homme et 10 chez la souris. Comme les gènes *MAGEA*, les gènes *MAGEB* sont peu conservés entre ces deux espèces et leur expression est limitée aux tumeurs et aux testicules. Contrairement aux gènes *MAGEA* qui sont exprimés dans les spermatogonies, l'expression des gènes *MAGEB* est localisée dans les spermatides rondes (Clotman et al., 2000).

Les gènes *Mageb1* et *b2*, localisés sur le chromosome X (entre les loci *Dmd* et *Ar* chez la souris) sont composés de trois exons dont seul le dernier est codant (Figures 10 et 11). Ils codent pour une même protéine de 330 acides aminés. Le gène *Mageb3* est localisé sur le chromosome 2. La séquence de *Mageb3* indique que ce gène est un variant *Mageb2* rétrotransposé sur le chromosome 2. En effet, il ne contient pas d'introns et sa séquence est identique à 98% à celle d'un transcrit *Mageb2*. Il code pour une protéine qui ne diffère que de 11 acides aminés par rapport à la protéine *Mageb1-b2* (De Backer et al., 1995).



**Figure 10 :** Localisation chromosomique des membres des sous-familles de gènes *MAGEA*, *B* et *C* humains (De Plaen et al., 1998).

**Figure 11 :** Localisation chromosomique des membres des sous-familles de gènes *MAGEA* et *MAGEB* de souris (De Plaen et al., 1998).

### I.2.2. Les gènes *MAGE* de type II

Les gènes *MAGE* de type II sont les gènes *MAGED*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, *L* et le gène *NECDIN*. Ces gènes sont exprimés dans de nombreux tissus somatiques normaux au cours du développement et chez l'adulte. (Bertrand et al 2004). Chez l'homme, les gènes *MAGED*, *E*, *H*, *I*, *J*, et *K* sont localisés sur le chromosome X. Les gènes *MAGEG*, *L* et le gène *NECDIN* se situent dans la région q11-q13 du chromosome 15 tandis que *MAGEF* est localisé sur le chromosome 3 (Figure 3). Les protéines *MAGE* de type II ne sont normalement pas antigéniques. Les protéines *MAGE* de type II les mieux caractérisées sont *NECDIN* et *MAGED1*. *NECDIN* fut le premier membre de la famille des gènes *Mage* à être fonctionnellement caractérisé. Les études réalisées sur *MAGED1* et *NECDIN* suggèrent un rôle de ces protéines dans le cycle cellulaire et le contrôle de la balance survie cellulaire/apoptose (Barker et al, 2002).

#### I.2.2.1. Le gène *NECDIN*

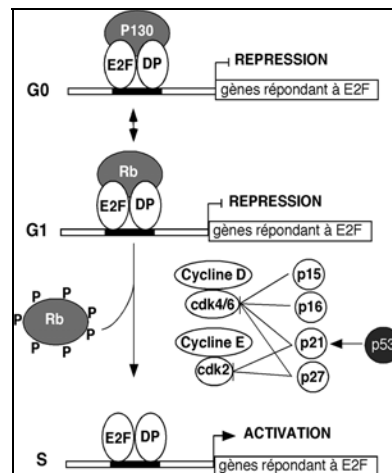
*NECDIN* est un gène *MAGE* mono-exonique qui code une protéine nucléaire de 325 acides aminés très conservée entre l'homme et la souris.

*NECDIN* est exprimé spécifiquement dans différentes cellules post-mitotiques (certains neurones et cellules musculaires) au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte (Uetsuki et al., 1996 ; Andrieu et al., 2003). *NECDIN* interagit avec le facteur de transcription E2F1 qui intervient dans la régulation de l'expression de gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire, et plus particulièrement à l'entrée des cellules en phase S (Taniura et al., 1998) (Figure 12). Lors de la phase G1 du cycle cellulaire, E2F1 est séquestré par la protéine du rétinoblastome (pRb). Sa fonction d'activateur transcriptionnel est donc inhibée. Lors de la transition de la phase G1 à la phase S, Rb est phosphorylé et libère E2F1 qui active alors la transcription de gènes impliqués dans la réplication de l'ADN. Rb est entre autre impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire de neurones lors de leur différenciation. Tout comme Rb, *Necdin* interagirait avec E2F1 et empêcherait l'entrée des neurones dans le cycle cellulaire. (Taniura et al., 1999, Taniura et al., 1998)

Chez l'homme, *NECDIN* se trouve dans la région q11-13 qui subit une empreinte génétique de sorte que seuls les allèles paternels sont exprimés (Mac Donald et al., 1997). De grandes délétions du chromosome paternel dans cette région constituent la cause la plus fréquente du syndrome de Prader-Willi (PWS), un trouble neurogénétique complexe touchant une naissance sur 10000. Chez la souris, la région C du chromosome 7 est synténique à la



région 15q11-13 de l'homme et contient des gènes homologues, y compris *Necdin*. Afin de tester l'implication de la déficience en *NECDIN* dans le PWS, des souris déficientes en *Necdin* ont été générées. Une fraction variable des souriceaux déficients en *Necdin* meurt dans les 1-2 jours qui suivent la naissance. Cette létalité serait due à une déficience des réflexes respiratoires. Cette létalité dépend du fond génétique des animaux. De plus, certains déficits rappelant ceux du syndrome de Prader-Willi chez les survivants déficients en *NECDIN*. Parmi ceux-ci, une réduction en neurones produisant l'ocytocine et la LHRH (Lutenizing Hormone-Releasing Hormone) dans l'hypothalamus et un retard de croissance. (Muscatelli et al 2000).

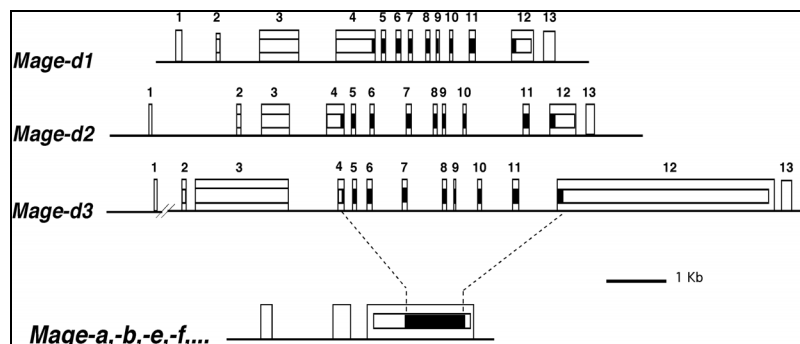


**Figure 12 :** Représentation schématique de facteurs de régulation du cycle cellulaire impliqués dans la transition de la phase G0/G1 à la phase S. D'après Yoshikawa.

Enfin, il a aussi été rapporté que *NECDIN* peut se lier à p53 et réprimer son activité transcriptionnelle (Taniura 1999). Une surexpression de *Necdin* protégerait les cellules de l'apoptose induite par p53. Ces résultats suggèrent que *NECDIN* pourrait être responsable du maintien de l'état post-mitotique des neurones et avoir un rôle dans la survie de certaines cellules du SNC (Taniura et al 1999, Taniura et al., 1998).

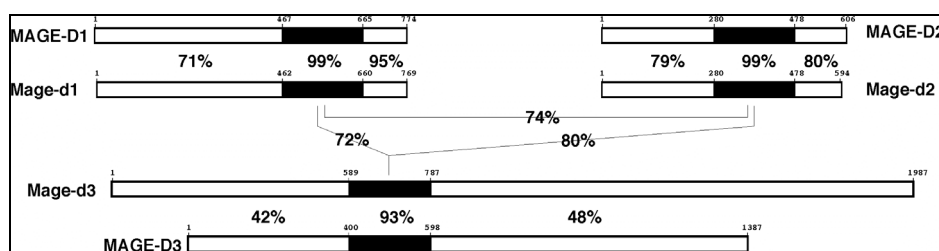
#### ***1.2.2.2. Les gènes *MAGED****

La sous-famille des gènes *MAGED* comporte 3 gènes chez la souris et 4 chez l'homme où ils sont situés dans la région p11 du chromosome X. Les gènes *MAGED* présentent deux différences fondamentales par rapport aux autres gènes *MAGE*. Premièrement, ils possèdent une structure génomique qui les distingue de tous les autres *MAGE*. Celle-ci comprend treize exons et la grille de lecture s'étale de l'exon de 2 à 12 alors que les autres gènes *MAGE* sont composés de 3 ou 4 exons dont seul le dernier est codant (Figure 13). La comparaison de la structure génomique des gènes *MAGED* et des autres gènes *MAGE* suggère que les *MAGED* actuels dérivent d'un gène ancestral possédant la même organisation génomique et que tous les autres membres de la famille *MAGE* aient été générés par rétropositions et duplications au départ de ce gène ancestral.



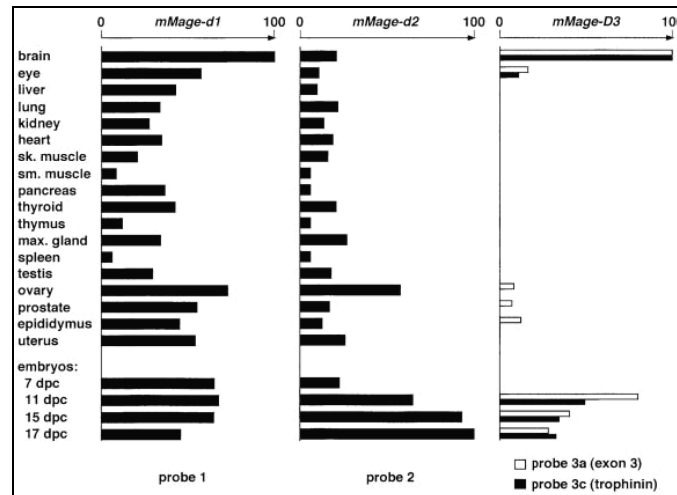
**Figure 13 :** Comparaison de la structure génomique entre les gènes *Maged* et les autres gènes *Mage* de souris. Les boîtes représentent les exons, les grilles de lectures sont représentées par des rectangles vides et le domaine MHD par des rectangles noirs.

La deuxième caractéristique intéressante des gènes *MAGED* est qu'ils sont très conservés entre l'homme et la souris. Les MHD des gènes *MAGED1*, *D2* et *D3* humains et de souris partagent 93% à 99% d'acides aminés identiques alors que, par exemple, seuls 56% des acides aminés du domaine MHD de *MAGEB1* sont identiques entre l'homme et la souris (figure 14). L'homologie entre orthologues humains et murins est plus importante qu'entre les paralogues de *MAGED* au sein de ces deux espèces. Cela indique que les gènes *MAGED1*, *2*, *3* sont apparus avant la séparation phylogénétique de l'homme et de la souris. La conservation de ces trois gènes durant l'évolution suggère que les trois protéines exercent des fonctions importantes et distinctes.



**Figure 14 .:** Représentation schématique des protéines MAGED1, MAGED2 et MAGED3 humaines et de souris. Les domaines MHD sont représentés par des boîtes noires. Le pourcentage d'acides aminés identiques partagés par les différentes régions des orthologues humains et de souris est indiqué. Entre protéines MAGED d'une même espèce, seuls les domaines MHD présentent de l'homologie de séquence.

Chez la souris, des analyses quantitatives ont permis de démontrer que les trois gènes *Maged* sont exprimés à différents niveaux dans de nombreux tissus (Figure 15). *Maged1* est fortement exprimé dans divers tissus et en particulier dans le cerveau et les ovaires chez l'adulte. *MageD2* est exprimé dans les ovaires et lors du développement embryonnaire. Tandis que *MageD3* est exprimé spécifiquement dans le système nerveux (Chomez et al., 2001)

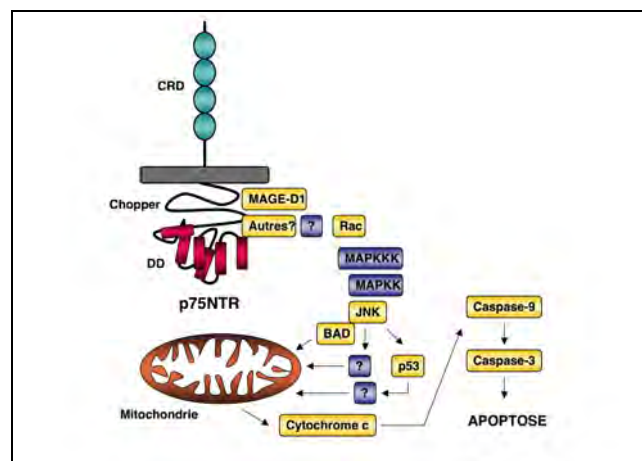


**Figure 15 :** Analyse semi-quantitative de l'expression des trois gènes *MAGED*. D'après Chomez *et al.*, 2001.

### I.2.2.2.1. MAGED1

#### 1) *MAGED1* interagit avec p75NTR

MAGED1 lie le domaine cytosolique du récepteur aux neurotrophines p75 (p75NTR), un membre de la superfamille des récepteurs au TNF (tumor necrosis factor). Les neurotrophines sont des facteurs de croissance impliqués dans la survie et la différenciation neuronale, la régulation de l'activité synaptique, l'apoptose,... La stimulation de p75NTR par les neurotrophines peut induire l'apoptose aussi bien in vitro qu'in vivo. MAGED1 serait impliqué dans la cascade de signalisation activée par p75NTR. Cette cascade signalétique est encore peu connue mais elle diffère de celle des autres membres de la superfamille des TNFR car elle n'implique pas les TRADD ni les FADD et ne permet pas l'activation de la caspase 8. L'activation de p75NTR par les neurotrophines entraîne l'activation des JNK (c-jun N-terminal kinases), ce qui mène à la phosphorylation du facteur de transcription c-jun qui déclenche la transcription de gènes cibles impliqués dans l'activation des caspases (Gu et al., 1999) (Figure 16).



**Figure 16:** Représentation schématique de la voie apoptotique du récepteur aux neurotrophines p75. p75NTR conduit à l'activation de la kinase JNK, à la libération de cytochrome c et à l'activation des caspase-9, -6, et -3. Les mécanismes reliant p75NTR à l'activation de JNK ainsi que ceux reliant JNK à la libération de cytochrome c ne sont que partiellement élucidés. Les boîtes jaunes indiquent les protéines de la voie signalétique identifiées expérimentalement. Les boîtes bleues représentent des participants potentiels. (Figure d'après la thèse de M. Bertrand, 2005)

De manière paradoxale, p75NTR peut également médier des signaux de survie cellulaire en activant la voie NF- $\kappa$ B par l'intermédiaire de TRAF. Le récepteur p75NTR peut donc avoir, comme d'autres récepteurs de la famille des TNFR, un rôle à la fois pro- et anti-apoptotique. (Roux et al., 2002 ; Dechant et al., 2002 ; Yoon et al., 1998)

## ***2) D'autres partenaires de MAGED1***

- Dlx5/Msx2

MAGED1 interagit aussi avec les protéines à homéodomaine Dlx5 et Msx2 qui jouent un rôle critique dans le développement du squelette. La région amino-terminale de Dlx5 présente un domaine d'activation transcriptionnelle. MAGED1 se lie à Dlx5 par un motif répété WQXPXX et à Msx2 par son domaine MHD. MAGED1 activerait la fonction transcriptionnelle de Dlx5 (Masuda et al., 2001).

- Ror2

Ror2 est une protéine de la famille des récepteurs tyrosines kinases qui joue un rôle crucial dans le développement, en particulier celui du squelette et du cœur. Un crible double-hybride a permis de mettre en évidence une association entre MAGED1 et Ror2. Des analyses d'hybridation in situ sur des embryons de souris montrent que les profils d'expression de MAGED1 et de Ror2 se superposent surtout au niveau de la face et des membres en développement. MAGED1 ferait l'objet d'une compétition entre Ror2 et Msx2. MAGED1 et Msx2 sont colocalisés dans le noyau en absence de Ror2. Lorsque Ror2 est exprimé, il séquestrerait MAGED1 dans les compartiments membranaires, ce qui empêcherait MAGED1 d'interagir avec Msx2 dans le noyau cellulaire où il exerce sa fonction de modulateur transcriptionnel. Ror2 régulerait donc l'activité transcriptionnelle de Msx2 par la séquestration de MAGED1 (Matsuda et al., 2003).

- Praja1

Praja1 est une protéine à « RING finger » qui a été isolée suite à un crible double-hybride utilisant le MHD de MageD1 comme appât. De nombreuses protéines « RING finger » possèdent une activité ubiquitine ligase E3. MAGED1 serait ubiquitinylée via Praja1 ce qui induirait sa dégradation par le protéasome. Msx2 forme des complexes avec Praja1 et MAGED1 et serait également dégradé par le protéasome en présence de Praja1. MAGED1 constituerait donc une molécule adaptatrice permettant aux protéines de la famille Dlx/Msx d'être reconnues et dégradées par le protéasome (Salehi et al., 2001, Sasaki et al. 2002).

- IAP

Les protéines IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) sont caractérisées par un domaine BIR riche en cystéine situé du côté amino-terminal et par un domaine RING en doigt de zinc du côté carboxy-terminal. Ces protéines exercent une fonction anti-apoptotique via leur domaine BIR. MAGED1 interagirait avec des XIAPs (X linked inhibitor of apoptosis) ce qui entraînerait une dégradation accélérée des XIAPs et favoriserait la mort cellulaire (Jordan et al., 2001)

- UNC5H1

UNC5H1 est un récepteur de la super famille des immunoglobulines qui lie les nétrines. Ces dernières jouent un rôle dans l'orientation des axones et dans la migration cellulaire. MAGED1 peut se lier à une courte séquence PEST (riche en Proline, acide glutamique, Sérine et Thréonine) située au niveau de la région juxta membranaire de UNC5H1 et serait impliqué dans l'apoptose induite par ce récepteur (Williams et al 2003).

#### **I.2.2.2.2. MAGED2**

Le gène *MAGED2* se situe sur le chromosome X dans la région F3 chez la souris et p11.22 chez l'homme. La protéine humaine MAGED2 est composée de 606 acides aminés et le domaine MAGE s'étend de l'acide aminé 279 au 478. Cette protéine possède également un domaine riche en arginine et deux domaines de faible complexité. Notre laboratoire a obtenu des souris « knock-out » pour *Maged2*. Ces animaux sont très anémiques et meurent d'hémorragies dans les 24 heures qui suivent la naissance.

#### **I.2.2.2.3. MAGED3**

*MAGED3* se situe dans la région p11.22 du chromosome X chez l'homme, à proximité de *MAGED2*. La protéine MAGED3 possède un domaine carboxy-terminal beaucoup plus long que celui de ses paralogues (Figure 12). Cette séquence COOH-terminale est principalement constituée d'une séquence répétitive de 9 acides aminés dont la fonction est inconnue (Chomez et al., 2001).

## **II. La mutagenèse dirigée dans les cellules souches**

### **II.1. Propriétés et intérêt des cellules souches embryonnaires.**

Les cellules souches embryonnaires sont isolées à partir d'embryons précoces de souris prélevés lors de la phase préimplantatoire du développement embryonnaire. Elles sont la contrepartie in vitro d'une population cellulaire qui existe in vivo : la masse cellulaire interne du blastocyste, cellules à l'origine de tous les tissus embryonnaires.

#### **II.1.1. L'obtention de cellules souches embryonnaires**

Les embryons au *stade blastocyste* constituent une source de cellules précieuses pour les généticiens. En effet, un aplatissement des cellules du trophoctoderme et une prolifération importante des cellules de la masse cellulaire interne peuvent parfois être observées lorsque des blastocystes sont déposés sur un tapis de cellules nourricières dans une boîte de culture. Ces cellules qui prolifèrent forment alors des grappes dérivées de la masse cellulaire interne et possèdent les *deux caractéristiques des cellules souches*. Elles sont capables de s'auto-renouveler pendant une durée prolongée –voire illimitée– et donneront naissance à deux cellules filles identiques ayant les mêmes caractéristiques que la cellule mère, lorsqu'elles se divisent in vitro. Elles ont la capacité de *proliférer* et de produire des types cellulaires hautement différenciés, lorsque l'environnement y est adapté. C'est pourquoi ces cellules sont appelées cellules souches embryonnaires ou ES (*embryonic stem*)

### II.1.2. Propriétés des cellules ES

Les cellules ES sont obtenues en absence d'agent immortalisant. Elles sont capables de proliférer éternellement sans qu'aucun signe de vieillissement de la culture n'apparaisse (sénescence). Aucun arrêt de la croissance cellulaire n'est donc observé et on ne connaît même aucune méthode permettant d'induire un arrêt de la croissance et une quiescence de ces cellules. D'autre part, les cellules ES ne présentent pas d'inhibition de contact : elles continuent de se diviser en boîte de culture malgré la confluence. Elles ne nécessitent pas de support pour croître et sont capables de former des colonies même lorsqu'elles sont au sein d'un milieu semi liquide tel que l'agar mou.

### II.1.3. L'utilisation des cellules ES pour la construction de chimères.

Les cellules ES peuvent être introduites dans un blastocyste hôte. L'injection de cellules ES dans un blastocyste est une manipulation délicate qui se réalise sous microscope au moyen de deux appareils de manipulation. L'un pour maintenir le blastocyste, l'autre pour manœuvrer une micropipette qui injectera 15 à 25 cellules ES dans le blastocoele de l'embryon hôte, contre les cellules de la masse cellulaire interne. Le blastocyste est ensuite transféré dans l'utérus d'une femelle receveuse. Les cellules ES, comme l'œuf au stade-1, ont pour potentiel de fournir à leur descendance tous les types cellulaires de l'organisme, en particulier la lignée germinale. Elles sont totipotentes. Les cellules ES ne possèdent néanmoins pas le pouvoir organisateur de l'œuf au stade-1. C'est pourquoi, il est nécessaire de les transplanter dans le blastocyste d'un embryon hôte normal pour qu'elles expriment leur totipotence. (Figure 17)

Si une modification génétique est introduite dans les cellules ES, l'approche expérimentale décrite ci-dessus permet d'obtenir, à partir de ces cellules ES produites in vitro, des souris portant la modification génétique. C'est le principe de base de la mutagenèse utilisant les cellules ES. Autrement dit, la totipotence des cellules ES et en particulier leur capacité à former des cellules germinales ouvre la possibilité de sélectionner, dans les cultures cellulaires in vitro, quelques cellules ES portant une modification génétique d'intérêt et d'introduire cette modification génétique dans un animal –la souris– dans le but d'en analyser les effets in vivo.

## II.2. Elaboration de souris modèles par recombinaison homologue

### II.2.1. La recombinaison homologue

La mutagenèse insertionnelle utilisant les rétrovirus a pour inconvénient que le locus muté ne peut être choisi par avance car le pro-virus s'intègre au hasard dans le génome. Après de multiples recherches, les généticiens ont découvert qu'il était possible d'introduire des mutations à un locus choisi via un processus ne laisse rien au hasard : la recombinaison homologue. Cette stratégie repose sur une similitude de séquence entre la construction fabriquée par l'expérimentateur et le locus où doit être introduite la mutation.

L'intégration se produit donc par un mécanisme de recombinaison homologue qui implique la reconnaissance d'homologie entre l'ADN exogène transfecté et le locus cible.

## II.2.2.Méthode d'introduction d'un fragment d'ADN exogène dans les cellules en culture

Le procédé utilisé pour introduire de l'ADN dans des cellules en culture est appelé transfection. Il existe à ce jour de nombreuses méthodes permettant d'introduire des acides nucléiques dans des cellules en culture. La méthode la plus efficace et la plus utilisée pour introduire de l'ADN dans les cellules souches embryonnaires est une méthode physique : l'électroporation. Les cellules ES et l'ADN sont placés dans une cuvette entre deux électrodes. Un choc électrique, court et intense est appliqué. La membrane cellulaire est alors temporairement criblée de pores par lesquels l'ADN peut pénétrer dans les cellules.

La transfection des cellules par électroporation impose de pouvoir distinguer les cellules non transfectées de celles qui ont intégré l'ADN exogène. Le criblage est facilité par l'introduction d'un gène de résistance à un antibiotique dans l'ADN transfecté. Le gène de sélection le plus fréquemment utilisé est le gène de la phosphotransférase néomycine (néo<sup>r</sup>) qui confère la résistance à un analogue de la néomycine, la généticine ou G418.

## **III. La mutagenèse conditionnelle utilisant le système Cre/loxP**

Lorsqu'un gène doit être muté en vue de l'étude de sa fonction, bon nombre de limitations sont rencontrées. Par exemple, l'inactivation de nombreux gènes entraîne une létalité embryonnaire à l'état homozygote. L'étude de la fonction du gène d'intérêt devient impossible à étudier au-delà du moment où les embryons meurent, et *à fortiori* chez l'adulte. De plus, l'inactivation d'un gène normalement exprimé dans différents tissus engendre souvent un phénotype complexe dont l'analyse est délicate. L'expression forcée de gènes peut aussi être incompatible avec le développement. Pour surmonter ces limitations, des stratégies, permettant une mutagenèse dite conditionnelle, ont été développées. Il s'agit, par exemple, de créer des souris portant la mutation « perte de fonction » dans un tissu déterminé dans le but d'étudier, dans ce seul tissu, les effets de la perte de fonction. Ces stratégies « conditionnelles » utilisent souvent la recombinaison homologue site-spécifique médiée par le recombinaise Cre du bactériophage P1.

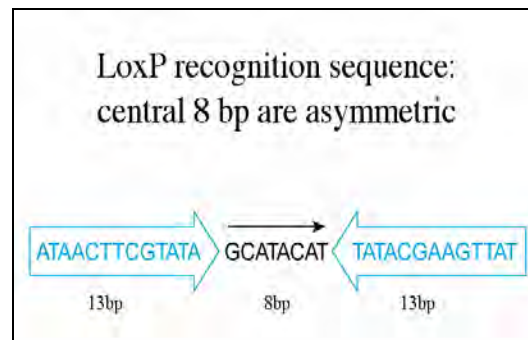
Ce système a permis de créer une grande variété d'animaux et de plantes génétiquement modifiée (Akagi et al., 1997).

### **III.1. Le système Cre/loxP**

Le système de mutagenèse conditionnelle le plus communément utilisé tire parti de la recombinaise Cre du Bactériophage P1. Celle-ci fait partie de la famille intégrase des recombinaises site-spécifique et est une enzyme essentielle intervenant dans le cycle de reproduction du phage P1. Dans sa phase lysogène, P1 se propage comme un plasmide (ADN double brin circulaire). Le système Cre/LoxP joue deux rôles dans le cycle viral de P1. L'ADN P1 se trouve sous la forme d'une molécule double brin linéaire dans le phage et doit être circularisé après son entrée dans la cellule. Le système Cre/LoxP est responsable de cette circularisation. Cre a aussi pour rôle de résoudre les dimères d'ADN P1 résultant d'une réplication ou d'une recombinaison homologue. Si des dimères sont présents lors de la division, seule une des deux cellules filles hérite de l'ADN P1 et celui-ci serait perdu pour l'autre cellule (Hoess et al., 1984). Contrairement à d'autres recombinaises bactériennes, l'activité catalytique de Cre, *in vivo* ou *in vitro*, n'implique aucun co-facteur bactérien, ni

aucune protéine accessoire encodée par P1 et ne requiert pas de conformation particulière de l'ADN hormis la présence des sites *LoxP*. Celui-ci peut être super-enroulé, circulaire ou linéaire. La recombinaise Cre peut donc être utilisée chez la souris à condition qu'elle soit exprimée dans le noyau des cellules. Dans ce but, la séquence codante de la Cre recombinaise a été modifiée par l'introduction d'une séquence signal de localisation nucléaire eucaryote appelée aussi séquence NLS. La recombinaise Cre peut être exprimée dans les cellules eucaryotes sans risque de recombinaison intra- ou inter- chromosomique car les séquences des sites *loxP* sont absentes des génomes eucaryotes (Nagy et al., 1999, Génétique de la souris).

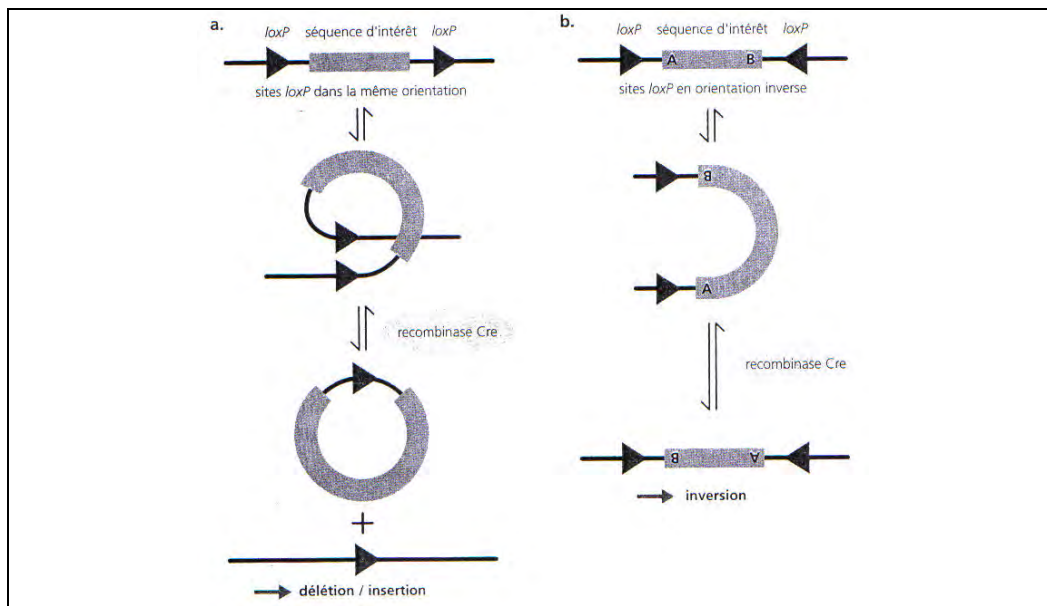
La recombinaise Cre catalyse des recombinaisons site-spécifiques au niveau de courtes séquences nucléotidiques appelées *LoxP* (pour *locus of X-over of P1*) (Akagi et al., 1997). Ces séquences *LoxP* sont constituées de deux séquences de 13bp palindromiques entourant d'une région « espaceur » de 8bp. La séquence espaceur est asymétrique et définit l'orientation du site *LoxP* (Hoess et al., 1984) (Figure 17). Une recombinaise se lie à chaque moitié palindromique d'un site *LoxP*, les molécules recombinaises forment alors un tétramère ce qui rapproche les sites *LoxP* (Voziyanov et al 1999). La recombinaison a lieu dans la région « espaceur » des sites *LoxP*. Le site *LoxP*, après recombinaison, est formé de deux moitiés complémentaires des sites *Lox* avant recombinaison.



**Figure 17 :** Le site *LoxP* reconnu par la recombinaise Cre du bactériophage P1.

Selon l'orientation respective des séquences *LoxP*, deux produits de réactions peuvent être obtenus. La recombinaison médiée par Cre entraîne la délétion de tout fragment flanqué de deux séquences *LoxP* lorsque les séquences de ces sites *Lox* sont dans le même sens. Après recombinaison, la séquence comprise entre les deux sites est excisée sous la forme d'un ADN circulaire et il ne subsiste dans l'ADN cible qu'un seul site *LoxP* (figure 18a). Lorsque les deux séquences *LoxP* sont dans des orientations opposées l'une par rapport à l'autre, la recombinaison ne conduit pas à l'excision du fragment compris entre les deux séquences *LoxP*, mais à son inversion (figure 18b). La combinaison de l'ensemble de ces outils permet de nombreuses manipulations du génome de la souris devient possible. Ceci peut aller de l'introduction de points de mutation spécifique à de grands remaniements chromosomiques. De plus, l'utilisation de l'activité recombinaise comme interrupteur d'activation ou d'inactivation génétique, de transgénèse conditionnelle ou de knock-out conditionnels devient possible (Nagy, 1999).





**Figure 18 :** La recombinaison catalysée par la recombinaise Cre produit deux types de remaniements en fonction de l'orientation des sites LoxP (génétique de la souris, Panthier 2003).

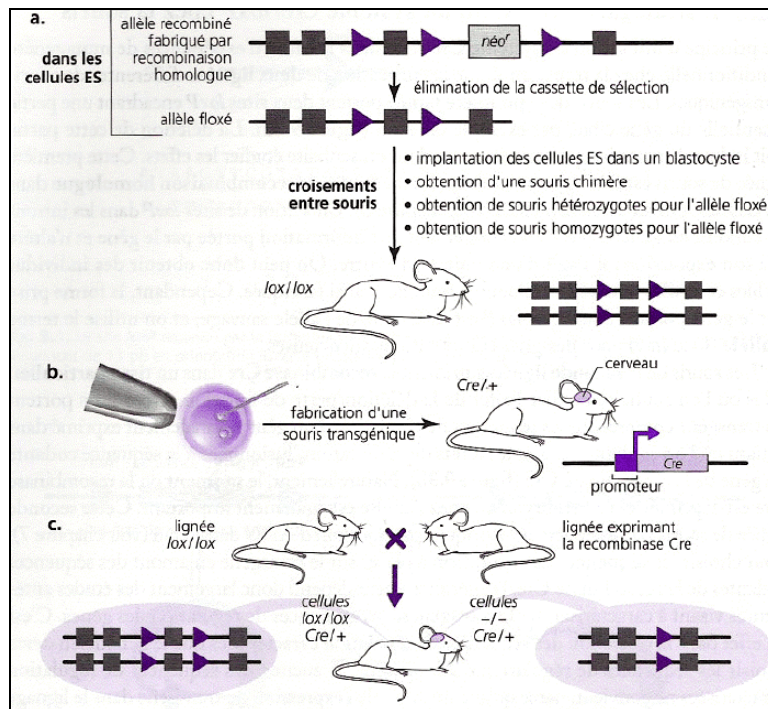
## III.2. Application du système Cre/LoxP chez la souris.

### III.2.1. Stratégie d'utilisation du système Cre/LoxP chez la souris

Peu après la démonstration d'une excision médiée par la recombinaise Cre dans des cellules en culture et in vivo dans des animaux transgéniques, l'idée de faire des transgénèses conditionnelles par excision médiée par Cre a fait surface (Lakso 1992). Le concept de base est apparu du besoin d'établir des lignées transgéniques où le produit de transgénèse présentait un problème de survie pour l'embryon ou dans le développement juvénile.

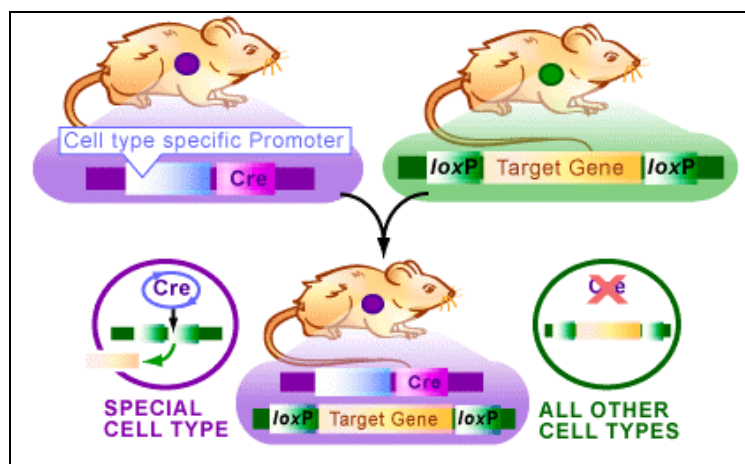
#### III.2.1.1. Les Knock-out conditionnels

Les expériences de mutagenèse conditionnelle utilisant le système Cre/LoxP chez la souris impliquent le plus souvent la fabrication de deux lignées différentes de souris transgéniques : l'une porte le gène cible (par exemple un exon encadré de deux sites LoxP) et l'autre exprime la recombinaise Cre dans le tissu où l'effet de la délétion/perte de fonction doit être étudiée. La première lignée de souris est créée par recombinaison homologe dans les cellules souches embryonnaires (Figure 19). L'insertion de sites LoxP dans les introns ne modifie normalement pas l'expression du gène (mutation neutre). Des individus homozygotes (lox/lox) pour la mutation peuvent alors être obtenus. La forme prise par le gène après insertion des deux sites LoxP diffère de celle de l'allèle sauvage, c'est pourquoi, le terme d'allèle « floxé » est utilisé pour désigner ces mutations silencieuses. La deuxième lignée de souris exprime la recombinaise Cre dans le tissu où l'on souhaite étudier l'effet de la délétion. Ces souris portent un transgène Cre sous le contrôle de séquences de régulation d'un gène normalement exprimé dans le tissu où l'étude des effets de la mutation est souhaitée (Figure 19). Le moment où la recombinaise Cre est exprimée est également important. Cette deuxième lignée de souris est en général obtenue par injection d'ADN dans l'œuf fécondé.



**Figure 19 :** Représentation schématique de l'utilisation du système Cre/LoxP pour la mutagenèse conditionnelle chez la souris (Panthier et al., 2003 : la génétique de la souris).

Des croisements entre ces deux lignées de souris fournissent des individus portant le locus floxé et qui expriment la recombinaise Cre dans le tissu ciblé (le coeur dans le cadre de la figure 20 présentée ci-dessous). Ces individus portent un allèle floxé dans toutes leurs cellules, sauf dans le tissu ciblé où la recombinaise Cre a excisé le gène cible. Cette approche expérimentale fournit donc une mutation conditionnelle : la mutation perte de fonction du gène cible est présente, à l'état homozygote, uniquement dans les tissus où la recombinaise est produite (Génétique de la souris, Nagy et al., 1999, Akagi et al., 1997).



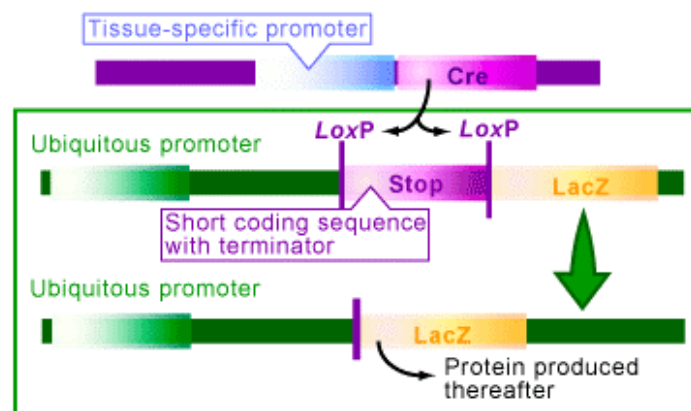
**Figure 20 :** Effet d'un croisement avec une souris Cre/*lox*. Les souris exprimant la protéine Cre dans un type cellulaire spécifique sont croisées avec des souris contenant un gène cible entouré de sites LoxP. A près ce croisement, les cellules portant Cre vont perdre le gène cible.

Une seconde approche peut également être utilisée pour exciser le segment d'ADN compris entre les sites LoxP. Des expériences récentes utilisent des adénovirus recombinants qui expriment le gène de la recombinaise Cre (Ade-Cre). Une suspension concentrée d'adénovirus est alors injectée dans le tissu cible de la souris portant l'allèle floxé.

L'excision fait fi de la spécificité cellulaire car toutes les cellules infectées par l'adénovirus Ade-Cre deviennent des cellules recombinantes indépendamment de leur type cellulaire. (Akagi et al., 1997)

### III.2.1.2 L'expression conditionnelle

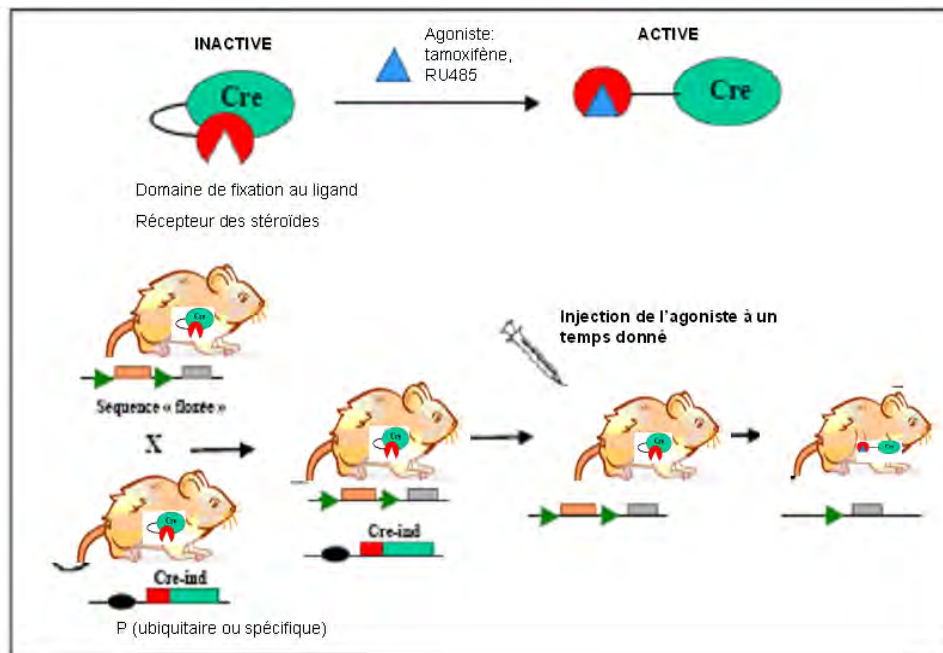
L'utilisation du système Cre/LoxP ne se limite pas à l'inactivation conditionnelle de gènes. Ce système peut être utilisé pour activer l'expression d'un transgène dans des cellules exprimant la recombinase Cre. La structure du transgène est simple, le promoteur est séparé de la région codant le gène d'intérêt par une séquence provoquant l'arrêt de la transcription (comportant un signal de polyadénylation) flanquée de deux sites LoxP (Figure 21). Lorsque cette cassette STOP est excisée par Cre, le gène est placé sous la dépendance du promoteur et peut être exprimé selon la spécificité du promoteur.



**Figure 21 :** Régulation de l'expression d'une protéine par le système Cre/LoxP. Le gène LacZ se situe en aval de séquences stop contenant un signal stop qui inhibe l'expression de ce gène. Lors de leur exposition à une protéine Cre, la cassette stop floxée est excisée et le gène peut être exprimé. L'expression du gène LacZ est donc régulée en fonction de la présence de Cre et en fonction du promoteur (ici ubiquitaire).

### III.2.2. Cre ER : une recombinase inducible par le tamoxifène

Pour améliorer encore la souplesse et les performances du système Cre-Lox, une variante conditionnelle de Cre (Cre-ER) a été créée. Dans cette variante, Cre a été fusionnée au domaine de fixation du ligand du récepteur aux oestrogènes humains (Figure 22). De plus, le récepteur aux oestrogènes (un récepteur nucléaire) utilisé est un récepteur mutant incapable de lier les oestrogènes naturels mais uniquement capable de lier le tamoxifène, un analogue synthétique des oestrogènes. L'activité recombinase de Cre-ER est donc dépendante de la présence de tamoxifène, ce qui permet d'activer la recombinase, au moment souhaité. Dans le cas d'expression conditionnelle de gène, par exemple, une séquence d'arrêt de la transcription encadrée de sites LoxP est insérée entre le promoteur et le transgène, bloquant de cette manière la transcription. L'activation « Tamoxifène-dépendante » de la recombinase Cre-ER induit la recombinaison au niveau des séquences loxP, l'élimination de la séquence d'arrêt de la transcription et autorise ainsi l'expression du transgène (Nagy et al., 1999).



**Figure 22 :** Schéma représentant l'activation Tamoxifène dépendante de la recombinaase Cre-ER.

La modification génétique induite par la recombinaase Cre en présence d'un allèle floxé est irréversible. Dans certains cas, il peut être intéressant de disposer d'un système où l'expression du gène cible est réversible. Pour ces cas, il existe des systèmes permettant d'induire ou de bloquer l'expression du transgène de manière réversible. Parmi ceux-ci, les systèmes d'expression régulés par la tétracycline. Cette technique se basant sur l'opéron tétracycline ne sera pas utilisée lors de ce mémoire.

## V. Objectif du mémoire

Le laboratoire de Génétique de l'URPHYM s'attache à étudier la fonction des protéines MAGE chez les mammifères.

Le gène *MAGEA1* est exprimé spécifiquement dans les testicules et dans certaines cellules tumorales. L'expression de *MAGEA1* dans les tumeurs est probablement causée par des événements de déméthylation du génome qui se produisent au cours du processus de transformation tumorale. Cette expression pourrait donc n'être qu'un épiphénomène. Il est cependant possible que l'expression de *MAGEA1* (et d'autres *MAGE* de type I) dans les tumeurs confère à celles-ci des propriétés favorisant leur transformation.

Nous avons entrepris de tester l'hypothèse selon laquelle *MAGEA1* pourrait être un oncogène. Dans ce but, *MAGEA1* sera transfecté dans des fibroblastes embryonnaires murins et la formation éventuelle de « foci » par les cellules transfectées sera évaluée. Le travail présenté ici s'inscrit dans un projet de développement d'une lignée de souris exprimant *MAGEA1* de manière conditionnelle. Cette lignée devrait permettre, après croisement avec différentes lignées de souris transgéniques Cre, d'exprimer *MAGEA1* dans différents tissus qui seront monitorés pour l'apparition éventuelle de tumeurs.

Indépendamment de notre hypothèse de départ (*MAGEA1* pourrait être un oncogène), le modèle que nous développons permettra d'évaluer in vivo les conséquences de l'expression de *MAGEA1* dont la fonction est toujours mal définie.



# **Matériels et méthodes**



# **I. Matériel**

## **I.1. Plasmides**

- pCDNAIA1

Pour faire la construction de ciblage, le cDNA de MAGEA1 a été excisé de pCDNAIA1 avec EcoRI.

- pBigT

Le plasmide pBigT consiste en la séquence acceptrice de splicing de l'adenovirus suivie d'un site LoxP, une cassette néo sous la dépendance du promoteur du gène Pgk (phosphoglucokinase), un terminateur transcriptionnel fort (séquence triple SV40 polyadénylation) que nous nommons tpA, un autre site LoxP dans la même orientation que le premier, un site de multiple clonage (MCS) et la séquence polyadénylation de l'hormone de croissance bovine. Un site PacI a été inclus en 5' du S.A., et un site AscI en 3' du bGH. Ces deux enzymes clivent rarement et la restriction résulte en des extrémités « collantes ». Elles peuvent être utilisées pour exciser la construction entière dans le but de l'insérer dans le plasmide contenant les bras génomiques ROSA26.

Ce plasmide nous a été fourni par le Dr. F. Constantini (Srinivas et al, 2001). Le MCS de pBigT contient des sites pour les enzymes de restriction NheI, SalI, AccI, XhoI, ApaI, SacII, NotI, SacI et BclI.

- pROSA26PA

Le plasmide pROSA26PA contient deux bras d'homologie permettant de recombinaison homologue dans l'ADN génomique de souris. Une cassette DTA et une cassette de résistance à l'ampicilline Ap<sup>r</sup>. Le site XbaI de ce plasmide a été remplacé par un linker (PacI, SwaI, AscI). De cette manière, il peut être digéré avec PacI et AscI et recevoir la séquence pBigT.

- P705-Cre

Ce plasmide permet l'expression de la recombinase Cre. Il est transformé dans une souche de E.coli, contenant un plasmide, porteur d'un marqueur de sélection floxé (ex : gène de résistance pGK-neo). Le promoteur Cre dans p705Cre est activable à 37°C et l'origine de réplication de p705 Cre est thermosensible de sorte que ce plasmide ne se réplique pas à 37°C. Ce plasmide porte un gène de résistance au chloramphénicol.

## I.2.Oligonucléotides

Les oligonucléotides proviennent de chez Eurogentec.

Oligonucléotides	Séquence de 5' en 3'
NeoF	5' GAA CAA GAT GGA TTG CAC GCA GG 3'
NeoR	5' CTC GTC AAG AAG GCG ATA GAA GGC 3'
A1S	5' TTC ATT GCC CAG CTC CTG C 3'
A1AS	5' CCC TCC CAC TGG CCC TGG CTG C 3'
bGHAS	5' ACT AGA AGG CAC AGT CGA GG 3'
ROSAS	5' AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT 3'
ROSAAS	5' GAT AAC AAC TCA GAG CGA CTT TG 3'
BigA1AS	5' CAT CAA GGA AAC CCT GGA CTA CTG 3'
MROSAS	5' CCT AAA GAA GAG GCT GTG CTT TGG 3'
AD1	5' GCATCGCATTGTCTGAGTAG
R	5' TCA CAC AGG AAA CAG CTA T 3'
F	5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'
A1I	5' CAG ATG TTC TCC TTG GTG CT 3'
MROSASAD	TCA GAG AGC CTC GGC TAG GTA 3'
AD2AS	GCA GAG AAC TCC CAG AAA GGT

## II. Methodes

### II.1. Techniques relatives à l'utilisation d'ADN

#### II. 1.1 Transformation d'Escherichia coli par choc électrique

- Dans un tube de bactéries DH5\_ électrocompétentes, ajouter 5 \_l de produit de ligation
- Mélanger doucement
- Transférer les bactéries dans une cuvette à électroporation préalablement refroidie dans la glace
- Provoquer un choc électrique court et intense, 5msec à 2300V
- Ajouter rapidement 300 \_l de milieu LB liquide
- Transférer le tout dans un tube Ependorff
- Incuber 1h à 37°C et étaler les bactéries sur deux boîtes contenant un milieu sélectif approprié et laisser pousser O/N à 37°C

#### II.1.2. Culture de bactéries

- Dans un falcon stérile, ajouter 5 ml de LB et 5 \_l d'ampicilline 100 mg/ml (Roche)
- Ensemencer ce milieu avec une colonie isolée de bactéries
- Incuber O/N, sans agitation, à 37°C

### II.1.3. Préparation d'ADN plasmide par lyse alcaline

- Ensemencer les bactéries dans 5 ml de LB + antibiotique et incuber O/N à 37°C
- Centrifuger 10 minutes à 2 500 rpm afin de culoter les bactéries
- Décanter et resuspendre les bactéries dans 300  $\mu$ l de GTE
- Vortexer et laisser 10 minutes à RT
- Ajouter 450  $\mu$ l de NaOH/SDS qui lyse les bactéries
- Retourner plusieurs fois le tube et laisser 10 minutes à 4°C
- Ajouter 360  $\mu$ l de KAc/HA qui précipite l'ADN chromosomique et mélanger
- Centrifuger 10 minutes à 14 000 rpm pour éliminer le précipité
- Reprendre le surnageant et y ajouter un volume de phénol-CiAA
- Vortexer et centrifuger 15 minutes à 14 000 rpm
- Reprendre la phase aqueuse et y ajouter 1 volume de chloroforme
- Vortexer et centrifuger 15 minutes à 14 000 rpm
- Reprendre la phase aqueuse
- Ajouter 2 volumes d'éthanol 100% et laisser 10 minutes à température ambiante
- Centrifuger 15 minutes à 14 000 rpm et décanter
- Ajouter 500  $\mu$ l d'éthanol 70% pour rincer le culot
- Décanter et laisser sécher le culot
- Reprendre le culot dans du TE

### II.1.4. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN dans un champ électrique en fonction du poids moléculaire. Le pourcentage d'agarose est inversement proportionnel au poids moléculaire (PM) des fragments à séparer. Du Bromure d'Ethidium (BrEth), un agent intercalant et fluorescent doit être ajouté à l'agarose. Le PM des fragments est estimé par co-migration des fragments d'ADN de PM connu, appelés marqueurs de Poids Moléculaire. Nous utilisons les marqueurs de PM 1kb et 100bp (Invitrogen). L'ADN déposé sur le gel peut être visualisé sous UV.

#### ***II.1.4.1. Les échantillons***

Dans 1 Eppendorf, ajouter 1  $\mu$ l d'ADN + 9  $\mu$ l de TE (1x) + 2  $\mu$ l de tampon de chargement (6x).

#### ***II.1.4.2. Marqueur de Poids Moléculaire pour ADN***

Dans 1 Eppendorf, ajouter 0,5  $\mu$ l de « 1 Kb DNA ladder » 1  $\mu$ g/  $\mu$ l (Invitrogen), 9,5  $\mu$ l de TE 1x et 2  $\mu$ l de tampon de chargement (6x).

#### ***II. 1.4.3. Préparation du gel***

- Le gel d'agarose (0,4%-1%) est coulé dans la cuve à électrophorèse contenant un peigne
- laisser le gel se solidifier
- retirer le peigne
- déposer les échantillons dans les puits ainsi que le marqueur de PM
- remplir la cuve de TAE 1x de façon à immerger le gel



- Faire migrer l'ADN par électrophorèse
- Lorsque les bandes d'ADN ont bien migré, prendre une photo sous UV

### II.1.5. Restrictions sur plasmide

- Dans un tube Eppendorf et dans la glace, ajouter :
  - o 2  $\mu$ l de tampon 10x correspondant à l'enzyme
  - o 1 unité d'enzyme de restriction par  $\mu$ g d'ADN de plasmide
  - o X  $\mu$ l de plasmide
  - o Porter à un volume final de 20  $\mu$ l avec de l'eau distillée
  - o Incuber 2 heures à 37°C

### II.1.6. Déphosphorylation d'un plasmide linéarisé

- ajouter 1  $\mu$ l de phosphatase alcaline de veau (CIP) au produit de restriction
- Incuber 1 heure à 37°C
- Ajouter 1  $\mu$ l d'EDTA 500 mM
- Incuber 10 minutes à 75°C
- Ajouter 1 volume de phénol CIAA, vortexer et centrifuger 15 minutes à 14000 rpm
- A la phase aqueuse, ajouter 1 volume de chloroforme, vortexer et centrifuger 15 minutes à 14000 rpm
- Précipiter à l'éthanol 100%
- Rincer le culot obtenu au moyen d'EtOH 70%
- Sécher le culot et le reprendre dans du TE

### II.1.7. Remplir les extrémités cohésives d'un plasmide linéarisé pour les rendre franches

Dans un eppendorf, ajouter

- 5 $\mu$ l de tampon
- 1 $\mu$ l de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 1 $\mu$ l de Klenow
- Porter à un volume final de 50 $\mu$ l avec de l'eau distillée
- Incuber 15 minutes à température ambiante et 10 minutes à 75°C
- Extraire l'ADN au phénol-chloroforme

### II.1.8. Ligation d'un plasmide

Ajouter le vecteur et l'insert dans un rapport moléculaire (1 :3) à :

- 2 $\mu$ l de tampon T4 DNA ligase 10x (NEB)
- 1 $\mu$ l de DNA T4 ligase (NEB)
- Porter à 20 $\mu$ l avec de l'eau
- Incuber à 16°C O/N

### II.1.9. Purification de l'ADN sur colonne (Kit Promega Wizzard ® SV Gel and PCR Clean-Up System).

Le Wizzard ® SV Gel and PCR Clean-Up System permet la purification de fragments d'ADN simple ou double brin. Le principe de ce kit est basé sur la liaison sélective de l'ADN sur une membrane de silice en condition fortement salée. Les contaminants ne sont pas retenus sur la membrane et sont éliminés par lavage. L'ADN est élué en condition de faible salinité.

#### ***II.1.9.1. Purification d'ADN à partir du gel d'agarose***

- Exciser le fragment de gel d'agarose contenant la bande d'ADN d'intérêt à l'aide d'un scalpel et mettre dans un tube de 1,5ml
- Dans un tube eppendorf, ajouter un volume de « membrane binding solution » (guanidine isocyanate) équivalent au poids du gel à purifier
- Vortexer et incuber 10 minutes à 55°C
- Vortexer à nouveau

#### ***II.1.9.2. Purification de l'ADN***

- Placer une mini colonne SV dans un tube collecteur
- Transférer le gel dissout sur une minicolonne SV et incuber une minute à température ambiante
- Centrifuger 1 minute la minicolonne à 10 000 rpm
- Vider le tube collecteur
- Laver la colonne au moyen de 700µl de « membrane wash solution » dilué avec de l'éthanol 95%
- Centrifuger une minute à 10 000 rpm
- Vider le tube collecteur
- Relaver la membrane par 500µl de « membrane wash solution »
- Centrifuger 5 minutes à 10 000 rpm
- Vider le tube collecteur
- Centrifuger une minute la colonne
- Ajouter 20µl de nucléase free water à la colonne
- Laisser une minute à température ambiante puis centrifuger une minute à 10 000 rpm
- L'ADN purifié peut être conservé au réfrigérateur

### II.1.10. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette technique permet l'amplification exponentielle d'un fragment d'ADN d'intérêt. Les séquences bordant le fragment à amplifier doivent être connues pour concevoir des amorces oligonucléotidiques (primers). La PCR se déroule en plusieurs étapes, la matrice d'ADN est d'abord dénaturée par chauffage en présence d'un excès d'oligonucléotides et de dNTP's. Afin de permettre l'hybridation spécifique des amorces, le mix est ensuite soumis à une diminution de température dépendant de la « température de melting » des amorces. La Taq DNA polymérase de Promega (gotaq), une ADN polymérase thermorésistante, amplifie la séquence comprise entre les amorces. Ce cycle de dénaturation/Hybridation/élongation est répété 30 fois.

Réactifs	Quantité pour 20µl
Tampon Taq DNA polymérase 5x	4µl
Mix dNTP's (2mM)	2µl
Primer sens (10µM)	2µl
Primer antisens (10µM)	2µl
Taq DNA polymérase	0.1µl
Template	30ng
Eau milli Q	Ajuster pour 20µl de volume total

Programme :

- Dénaturation de 5 minutes à 94°C
- Trente cycles d'amplification divisés en trois étapes :
  1. Trente secondes à 94°C pour dénaturer
  2. Trente secondes à X°C pour hybrider où  $X = T_m - 5^\circ\text{C}$
  3. Y minute(s) à 72°C pour l'élongation où Y = la taille (Kb) du fragment à amplifier
- Elongation finale de 10 minutes à 72°C

La température de melting (TM) des amorces se calcule par la formule  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ . Ce calcul ne prend en compte que la partie s'hybridant au premier cycle de dénaturation.

L'ADN génomique peut être remplacé par une culture bactérienne (PCR sur colonies) sans extraction d'ADN. Les bactéries sont alors lysées lors de la première étape de dénaturation à 94°C.

## II.1.11. Criblage par hybridation d'une sonde radioactive

### II.1.11.1. Préparation des membranes pour l'hybridation

- Déposer une membrane Hybon N+ sur la boîte de colonies bactériennes de manière à faire une réplique de la boîte. La membrane Hybon N+ est une membrane optimisée pour le transfert d'acides nucléiques (Amersham Bioscience)
- Déposer la membrane sur une boîte LB + ampicilline colonies vers le haut et incubé quelques heures à 37°C
- Dénaturer
  - 5 minutes dans du NaOH 0,5M (sur du papier watman)
  - 5 minutes dans Tris 1M pH 7,5
  - 5 minutes dans Tris 0,5M pH 7,5 + NaCl 0,125M
  - Sécher à 55°C

### II.1.11.2. Préparation de la sonde radioactive et hybridation

- Amplification de la sonde par PCR

Une PCR a été effectuée sur pcDNAIA1 avec les oligos A1S et A1AS (protocole PCR cf.II.1.10)

Programme :

5 minutes à 94°C

30 secondes à 94°C  
30 secondes à 57°C  
2 minutes à 72°C  
10 minutes à 72°C

- Purification de la sonde par Wizzard (protocole II.1.9)
- Marquage de la sonde.

Le marquage radioactif de la sonde a été réalisé par la polymérase d'ADN après amorçage aléatoire avec le **kit « RadPrime ADN labelling »** system (Invitrogen). Le « Rad Prime DNA labeling System » est conçu pour la préparation rapide de sondes marquées au  $^{32}\text{P}$ . Des Primers vont s'hybrider au hasard sur l'ADN template dénaturé. Il y a alors amplification par la klenow en présence de  $^{32}\text{P}$ dCTP pour produire la sonde.

Dans un tube eppendorf, ajouter :

- 19µl d'eau
- 20ng d'ADN v(2µl)
- Pour dénaturer l'ADN, faire bouillir 5' dans un bain d'eau bouillante à 100°C
- Refroidir immédiatement dans la glace
- Ajouter :
  - 1µl d'ATP 500µM
  - 1µl dGTP 500µM
  - 1µl dTTP 500µM
  - 20µl 2,5x Random Primers solution
  - 5µl dCTP radioactive ( $^{32}\text{P}$ )
- Incuber 10 minutes à 37°C
- Déposer la sonde marquée sur une mini Quick Spin Colonne (Microbiospin P-30 Tris Chromatography columns) afin 'éliminer les dNTP non incorporés
- Centrifuger 1 minute à 1000 rpm. L'échantillon purifié est alors dans le buffer Tris
- Ajouter 150µl de DNA carrier (2mg/ml) et 800µl d'eau à la sonde
- Dénaturer 5 minutes à 100°C
- Ajouter la sonde marquée à la membrane qui aura au préalable été préhybridée
- Incuber O/N à 65°C

- Lavages

Incuber :

- 2x 5 minutes dans du SSC 2x à RT
- 2x 30 minutes dans du SSC 2x, 1% SDS à 60°C
- 1x 30 minutes dans du SSC 0,1x à RT
- 1x 30 minutes dans du SSC 0,1x à 65°C

- Révélation

- Poser la membrane hybridée entre deux feuilles de saran
- Placer un film autoradiographique sur le saran et fermer la cassette (en chambre noire)
- Attendre 45 minutes
- Révéler par passages successifs dans trois bacs contenant :
  - Du révélateur
  - Du fixateur

De l'eau

## II.1.12. Test de recombinaison des sites LoxP

### *II.1.12.1. Production de bactéries compétentes Cre.*

- Ensemencer des bactéries contenant p705 Cre dans du milieu LB + Chloramphénicol
- Incuber O/N à 30°C
- Diluer la culture bactérienne de manière à obtenir une DO de 0,1 à 600nm
- Réincuber les bactéries à 30°C avec agitation jusqu'à obtention d'une DO entre 0,5 et 0,7 pour que les bactéries soient en phase exponentielle de croissance
- Refroidir les bactéries dans la glace 10 minutes
- Centrifuger 20 minutes à 4 200 rpm à 2°C
- Décanter et resuspendre le culot dans de l'eau stérile froide
- Centrifuger 20 minutes à 4 200 rpm
- Décanter et resuspendre à nouveau le culot dans de l'eau stérile froide
- Recentrifuger 20 minutes à 4 200 rpm à 2°C
- Décanter immédiatement et resuspendre le culot dans le liquide résiduel
- Ajouter 40ml de glycérol 10% à froid et mélanger
- Centrifuger à 2 800 rpm 10 minutes à 2°C
- Décanter
- Reprendre le culot dans un volume égal e glycérol 10% froid
- Aliquoter en différents tubes de 100µl
- Stocker à -70°C

### *II.1.12.2. Transformation de bactéries compétentes Cre par pROSA26Neo-A1.*

- A un échantillon de bactéries DH5\_ compétentes, ajouter 2µl de pROSA26Neo-A1
- Appliquer un choc électrique court et intense : 5msec à 2300V
- Ajouter 300µl de LB et incuber 1h30 à 30°C
- Etaler sur du milieu LB+ ampicilline et incuber O/N à 37°C de manière à permettre l'activation de la transcription

## **II. Techniques sur cellules souches embryonnaires.**

### **II.2. Culture de cellules souches**

#### II.2.1. Préparation de la couche nourricière (feeder layer)

#### II.2.2. Cultures de cellules ES sur MEFs

- Recouvrir la boîte de culture ou les puits avec de la gélatine 0.1% durant 30 minutes à RT ou over night à 4°C
- Dégeler à 37°C des MEFs traitées à la Mytomicine
- Centrifuger les cellules dans 10ml de milieu complet pour MEFs (5 minutes à 1200rpm)

- Ensemencer les cellules sur une surface recouverte de gélatine
- Incuber O/N à 37°C / 5% CO<sub>2</sub>
- Dégeler à 37°C des cellules ES et ensemer sur approximativement deux fois la surface originale
- Incuber à 37°C / 5% CO<sub>2</sub>
- Rafraîchir le milieu le lendemain
- Rafraîchir le milieu avant que celui-ci ne devienne (orange-jaune) ; généralement après un, deux ou trois jours
- Passer les cellules lorsque celles-ci sont à confluence :
  - Laver les cellules dans un petit volume de PBS
  - Trypsiniser au moyen de 3ml de TVP (10x) pour une T75 pendant 10 minutes à 37°C
  - Détacher les cellules en secouant doucement et en frappant sur la boîte
  - Ajouter 1ml de milieu et resuspendre en cellules simples avec une pipette de 10ml
  - Réensemencer en divisant à 1 :2, 1 :3, ...
- Les cellules ES peuvent être congelées dans du milieu complet + 10%DMSO+  $\beta$ -Mercaptoethanol

## **II.3. Electroporation**

### **II.3.1. ADN**

- Linéariser le vecteur par KpnI
- Extraire l'ADN au phénol/ Chloroform et Chloroform
- Précipiter à l'Ethanol
- Sécher le culot et redissoudre dans 300µl de PBS
- Tester la concentration d'ADN sur gels d'agarose ou mesure de la densité optique à 260nm

### **II.3.2. Les cellules souches**

- Trypsiniser les cellules ES ; utiliser une boîte de culture T75 par expérience
- Laver les cellules avec un petit volume de PBS
- Ajouter 3ml de TVP (10x) par T75
- Incuber 5 minutes à 37°C
- Détacher les cellules
- Ajouter 3 ml de milieu complet et resuspendre en cellules simples avec une pipette de 10ml
- Centrifuger les cellules pendant 5 minutes à 1200 rpm à RT
- Resuspendre le culot dans 300µl de PBS

### II.3.3. Electroporation

- Mélanger les cellules avec l'ADN ( $\approx 75\text{-}100\mu\text{g}$ ) \_  $\pm 600\mu\text{l}$
- Laisser 5' à RT
- Transférer le mélange dans une cuvette Biorad de 0,4cm
- Electroporer les cellules avec un Electroporateur Biorad (Biorad gene pulser model 1652078) :
  - Voltage 0,8kV
  - Capacitance :  $1\mu\text{F}$
  - 1 pulse donne un temps constant de 0,04 ms
- Laisser 5' à RT
- Suspendre les cellules dans du milieu pour cellules ES et semer sur Petri (10cm) contenant des MEFs MMC
- Incuber O/N à  $37^{\circ}\text{C}$  / 5%  $\text{CO}_2$

### II.3.4. Sélection à la généticine

- Changer le milieu nutritif des cellules et y ajouter une drogue appropriée à une sélection des cellules ayant incorporé la construction
  - G418 (généticine):  $300\mu\text{g/ml}$
- Nourrir les cellules avec du milieu sélectif tous les jours pendant 6 à 8 jours
- Après 6 à 8 jours, des colonies individuelles peuvent être observées

## II.4. Culture des cellules sélectionnées sur plaque 96 puits

### II.4.1. Culture des colonies de cellules ES sur plaque 96 puits

- Préparer une plaque 96 puits (fond en U) avec  $15\mu\text{l}$  de PBS par puit en utilisant une pipette multichannel
- Piquer des séries de 24-36 colonies et transférer dans la plaque 96 puits
- Ajouter  $15\mu\text{l}$  de TVP 10x dans chaque puit et incuber 10 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$
- Ajouter  $100\mu\text{l}$  de milieu et resuspendre
- Les colonies trypsinisées sont alors transférées dans une deuxième plaque 96 puits couverte de MEFs et  $100\mu\text{M}$  de milieu pour cellules ES + LIF + Généticine
- Cultiver les cellules O/N et rafraîchir le milieu ( $200\mu\text{l}$ )
- Cultiver les cellules à (semi)confluence (2 jours)
- Laver les cellules au PBS et trypsiniser avec  $50\mu\text{l}$  de TVP 10x (5' à  $37^{\circ}\text{C}$ )
- Ajouter  $150\mu\text{l}$  de milieu complet et resuspendre
- Transférer deux portions de  $100\mu\text{l}$  de cellules en suspension dans deux plaques 96 puits couverte de MEFs traitées à la MMC et  $100\mu\text{l}$  de milieu
- Une plaque est cultivée à semi-confluence (2-3 jours) et préparée pour la congélation
- L'autre plaque est cultivée aussi longtemps que possible pour en isoler l'ADN ( $\pm 5\mu\text{g}$  d'ADN par puits)

### II.4.2. Procédure de congélation

- Préparer du milieu complet (sans LIF) avec 20% de DMSO à  $0^{\circ}\text{C}$
- Laver les cellules au PBS et trypsiniser avec  $30\mu\text{l}$  de TVP 10x
- Ajouter  $75\mu\text{l}$  de milieu complet et resuspendre doucement

- Ajouter 100µl de milieu plus 20% de DMSO et resuspendre encore doucement
- Envelopper la plaque dans une serviette en papier et placer la boîte dans une frisette à -80°C (les cellules peuvent être stockées pour au moins 6 semaines)

#### II.4.3. Isolation de l'ADN

- Laver les cellules avec du PBS 2x
- Ajouter 150µl de tampon de lyse contenant 100µg de protéinase K
- Incuber au moins 2 heures à 55°C
- Transférer le lysat dans des tubes eppendorf contenant 150µl d'éthanol 100%
- Centrifuger
- Rincer à l'Ethanol 70%, sécher à l'air
- Dissoudre l'ADN dans 100µl de TE





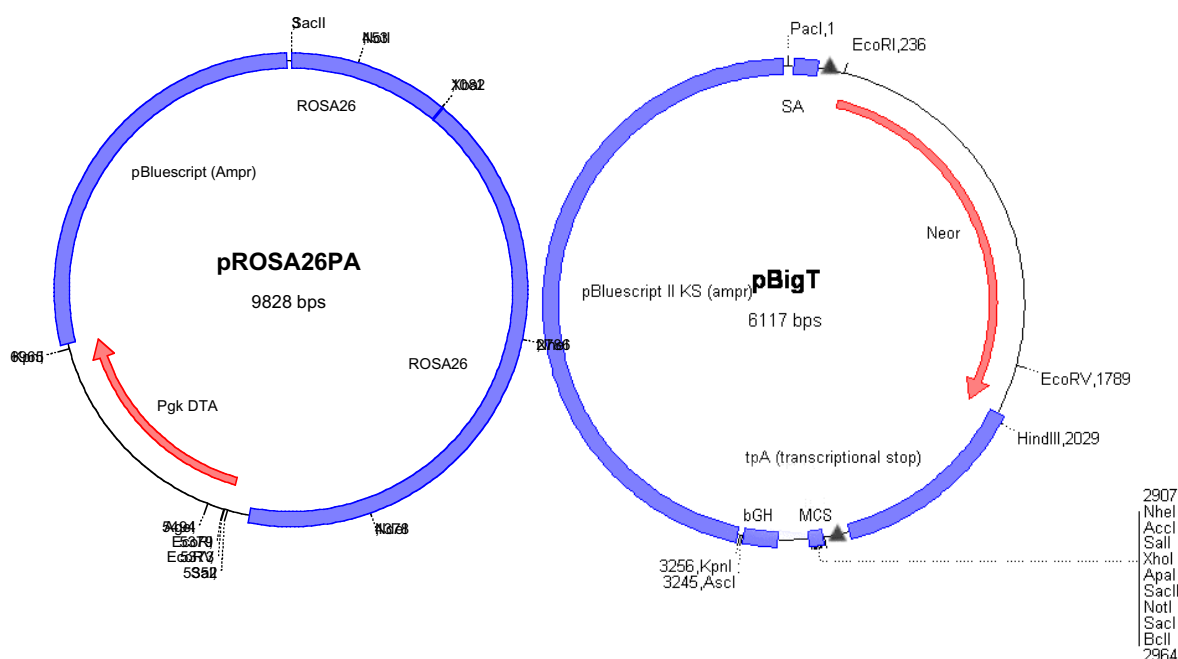
# Résultats et discussion



## I Stratégie élaborée afin de générer des souris exprimant *MAGEA1* de manière conditionnelle.

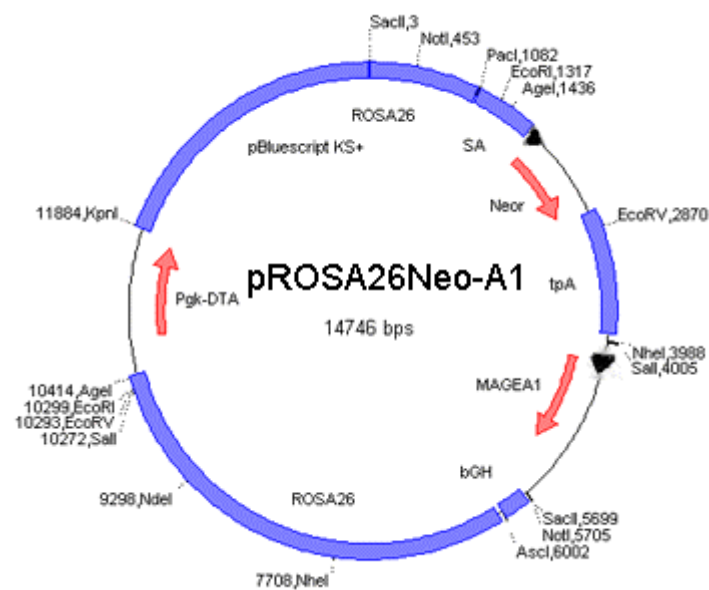
L'obtention de souris exprimant *MAGEA1* de façon ubiquiste pourrait être impossible car l'expression de *MAGEA1* pourrait être incompatible avec le développement. Afin de contourner ce problème, nous avons élaboré un système d'expression conditionnelle de *MAGEA1*, utilisant le système Cre-lox, que nous introduirons dans le génome de la souris via la manipulation de cellules ES.

Utiliser le système Cre-lox pour activer, de manière conditionnelle, la transcription de *MAGEA1* impliquait l'insertion de ce gène derrière un terminateur transcriptionnel (tpA) flanqué de deux sites *LoxP*. Nous avons choisi d'introduire le transgène dans un locus comportant un promoteur « ubiquiste », le locus ROSA26. Pour permettre la double recombinaison homologue de notre construction dans l'ADN génomique de souris, il nous fallait insérer notre cassette contenant *MAGEA1* entre deux « bras d'homologie ». Dans ce but, nous avons demandé au D<sup>r</sup> F. Constantini de nous fournir deux vecteurs : pBigT et pROSA26PA. pROSA26PA contient deux bras d'homologie (permettant la recombinaison homologue), une cassette DTA (pour contre-sélectionner les cellules ES qui auront intégré notre vecteur d'expression par intégration aléatoire plutôt que par recombinaison homologue) et une cassette de résistance à l'ampicilline Ap<sup>r</sup>. pBigT contient une cassette que nous appellerons « neolox », constituée d'un gène de résistance à la néomycine (Neo<sup>r</sup>), sous la double dépendance d'un promoteur procaryote (Tn5) et du promoteur mammalien du gène phosphoglucokinase (Pkg), suivi d'un terminateur transcriptionnel fort (tpA). L'ensemble Pkg-Neo-tpA que nous appellerons « floxed NeopA » est flanqué de deux sites *LoxP* (Figure23).

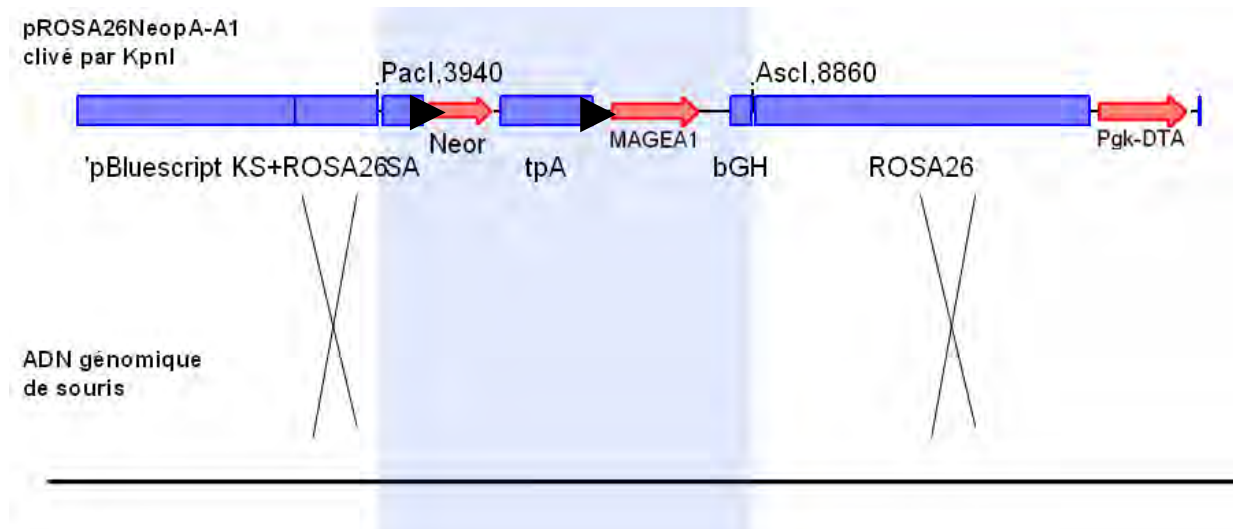


**Figure 23 :** Représentation schématique de pROSA26PA et de pBigT. Les sites *LoxP* sont indiqués par une pointe de flèche noire.

Voir annexe



Restreint par KpnI  
+Transformation de cellules ES



**Figure 24 :** Schéma récapitulatif des différentes étapes, au niveau de l'ADN, de la construction du vecteur d'expression conditionnelle de MAGEA1. Les sites lox sont représentés par une pointe de flèche noire.

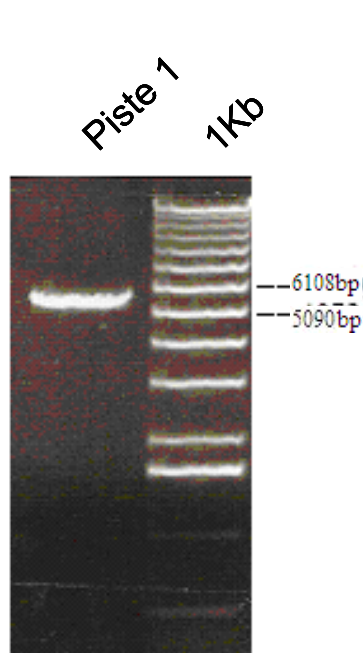
## II. Résultats

Au cours de ce mémoire, nous avons élaboré un vecteur d'expression conditionnelle de *MAGEA1*, activable par le système Cre/Lox, et avons introduit ce vecteur, que nous appellerons pROSA26Neo-*A1*, dans des cellules ES (Figure28) (Soriano et al. 1999).

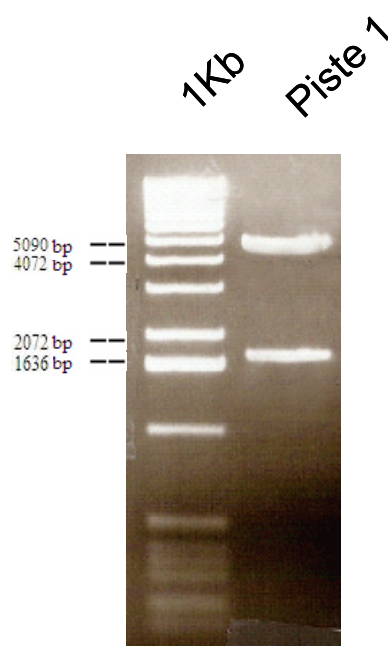
### II.1. Insertion de *MAGEA1* en aval d'une cassette « Neo floxée » formant un terminateur de transcription conditionnel

#### II.1.1. Construction du vecteur pBigT*A1*

Au laboratoire, nous disposons de l'ADNc de *MAGEA1* cloné dans pcDNA1*A1*. Nous avons excisé l'ADNc de *MAGEA1* de ce vecteur par EcoRI (Figure 26). Les extrémités cohésives formées à la suite de cette restriction ont été remplies avec la polymérase de Klenow de manière à obtenir des extrémités franches. Ensuite, le fragment a été ligué avec du pBigT préalablement linéarisé par XhoI, déphosphorylé et dont les extrémités avaient été remplies avec la polymérase de Klenow (Figure 25).



**Figure 25:** Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose de pBigT digéré par XhoI, déphosphorylé et traité à la Klenow afin d'obtenir des extrémités franches. 1Kb= marqueur de poids moléculaire.

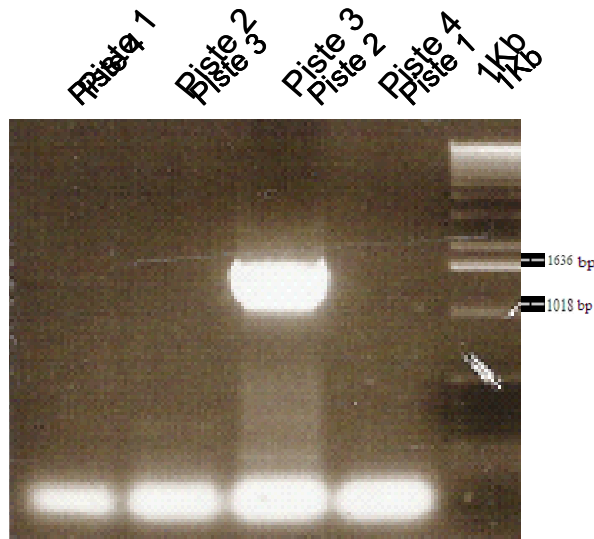


**Figure 26:** Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose de pcDNA1*A1* digéré par EcoRI et traité à la Klenow. 1Kb= marqueur de poids moléculaire.

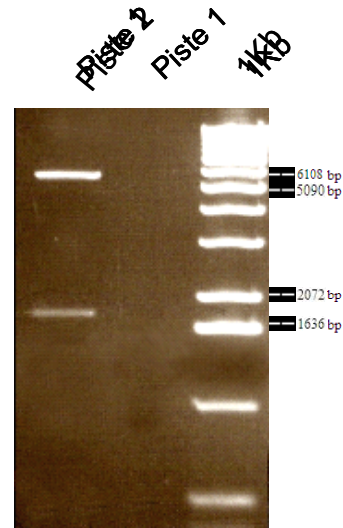
Des bactéries ont été transformées par le produit de cette ligation et cultivées sur un milieu contenant de l'ampicilline de manière à sélectionner les transformants.

Afin d'identifier les clones Ap<sup>r</sup> contenant le plasmide voulu (c'est-à-dire pBigT avec *MAGEA1* inséré dans la bonne orientation), nous avons criblé une quarantaine de colonies Ap<sup>r</sup> par PCR en utilisant une amorce sens se liant dans *MAGEA1* (A1S), et une amorce s'hybridant à l'autre brin au niveau de la séquence bGH de pBigT qui contient un signal de polyadénylation (bGH-AS). Les produits de la PCR ont été analysés par électrophorèse en gel

d'agarose. La présence d'une bande de 1600 bp indique que le clone n°34 contient probablement le plasmide voulu (Figure 27). L'ADN plasmidique du clone n°34 a été préparé par lyse alcaline et digéré par les enzymes de restriction NotI et NheI clivant dans le MCS de part et d'autre du site d'insertion du cDNA de *MAGEA1*. La présence de deux bandes, l'une de 1750 bp et l'autre de 6070 bp confirme que le clone 34 contient bien le plasmide attendu (Figure 28). Ceci a aussi été vérifié par séquençage à l'aide des amorces A1I et bGH-AS qui permettent de déterminer la séquence des jonctions entre pBigT et l'ADNc de *MAGEA1*. Dans la suite du texte, le plasmide du clone 34 sera appelé pBigT-*A1* et la cassette lox-neopA-lox-*MAGEA1* sera désignée « floxed NeopA-*A1* ».

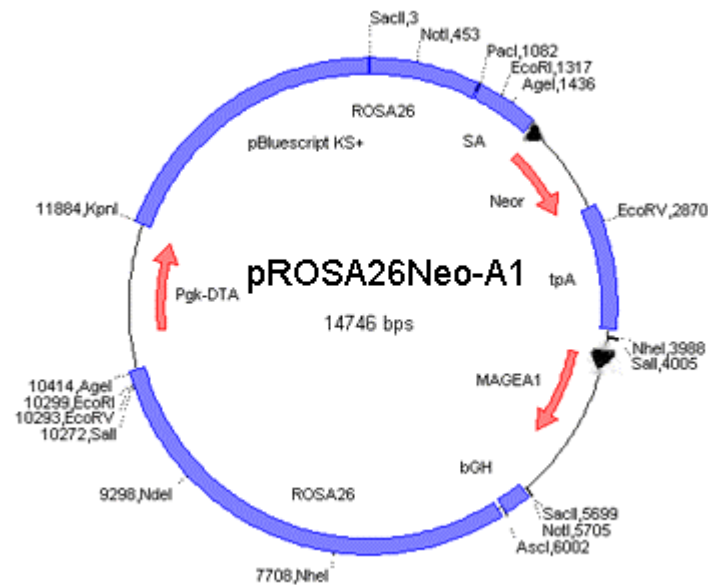


**Figure 27 :** Photographie après électrophorèse en gel d'agarose montrant le produit de PCR obtenu sur le clone 34. La présence d'une bande à 1600bp indique que le clone 34 a intégré la cassette *MAGEA1* en SENS. 1Kb= marqueur de poids moléculaire.

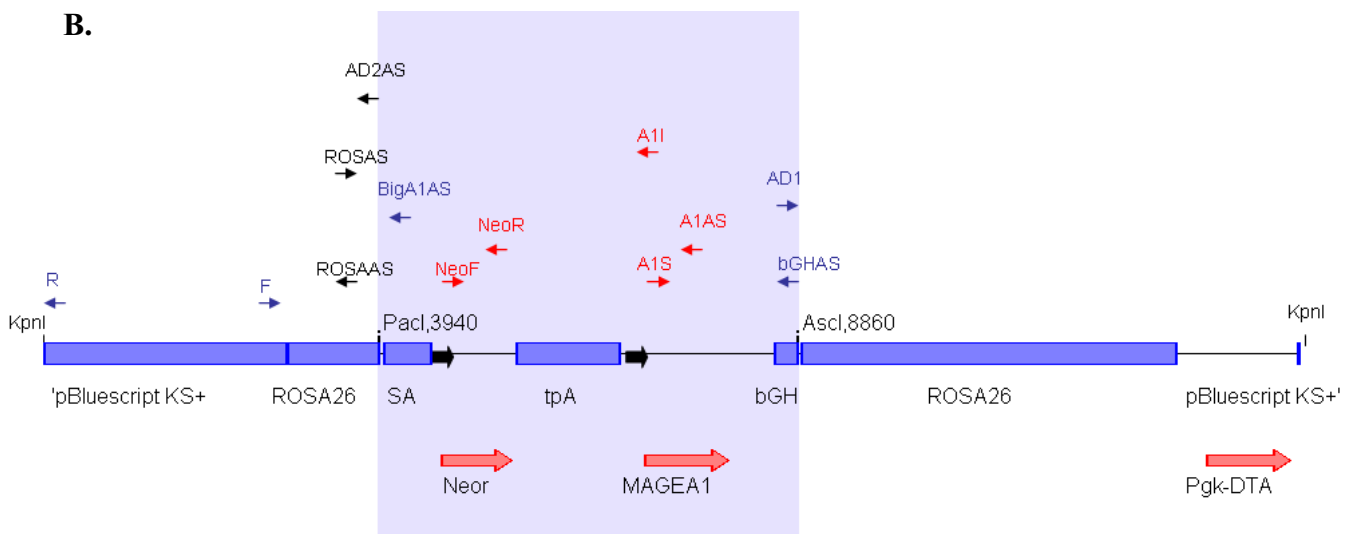


**Figure 28 :** Photographie après électrophorèse en gel d'agarose du profil de restriction par NotI et NheI de pBigT-*A1*. 1Kb= marqueur de poids moléculaire.

A.



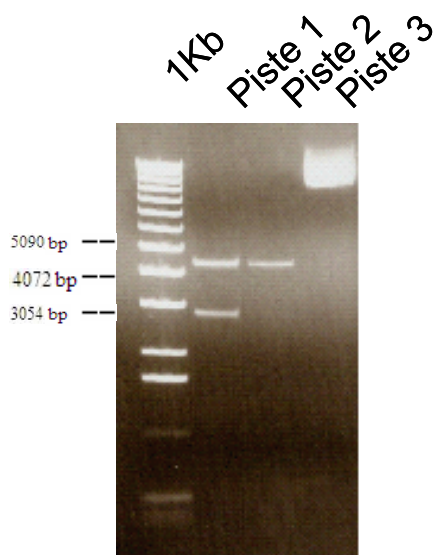
B.



**Figure 29 :** Schéma du vecteur d'activation conditionnelle de *MAGEA1* : *pROSA26Neo-A1*. (A) La cassette « floxed NeopA » est flanquée de sites LoxP et situées en amont du gène *MAGEA1*. Le tout, appelé « cassette floxed NeopA-*A1* », est encadré de deux bras d'homologie : un petit bras en 5' et un grand en 3'. Les flèches indiquent le sens de transcription de *MAGEA1*, Neo et DTA. Les sites LoxP sont indiqués par une pointe de flèche noire. (B) Représentation schématique de *pROSA26Neo-A1* linéarisé par KpnI. Les amorces utilisées au cours de ce mémoire sont représentées par des flèches.

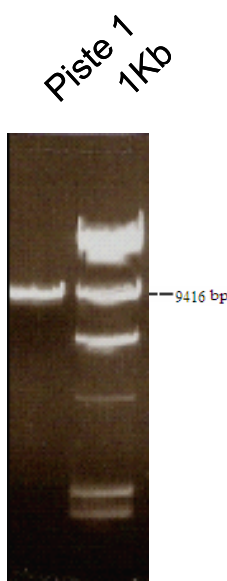
## II.2. Insertion de la cassette « floxed-NeopA-A1 » entre les deux bras d'homologie de pROSA26PA

La cassette « floxed NeopA-A1 » a ensuite été insérée entre les deux bras d'homologie de pROSA26PA. Nous avons excisé la cassette de pBigT-A1 avec les enzymes de restriction AscI et PacI. Les produits de cette digestion ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose et la bande de 4400 bp correspondant à la cassette « floxed NeopA-A1 » a été purifiée à partir du gel (Figure 30)



**Figure 30 :** Photographie après électrophorèse en gel d'agarose. Le clone pBigT-A1 a été digéré par AscI et PacI. La piste n°1 correspond à la restriction de pBigT-A1 par AscI et par PacI. La bande de 4400 bp correspond à la cassette « Floxed NeopA-A1 ». Ce fragment a été purifié sur gel (piste n°2). pBigT-A1 non restreint a été déposé sur la piste n°3. 1Kb=marqueur de poids moléculaire.

Parallèlement, nous avons digéré pROSA26PA par AscI et par PacI (Figure 31).

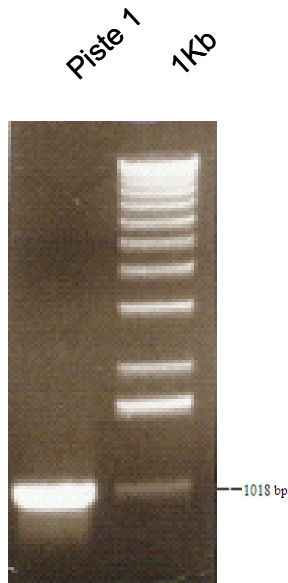


**Figure 31 :** Photographie après électrophorèse en gel d'agarose du profil de restriction par AscI et PacI de pROSA26PA. \_hindIII= marqueur de poids moléculaire

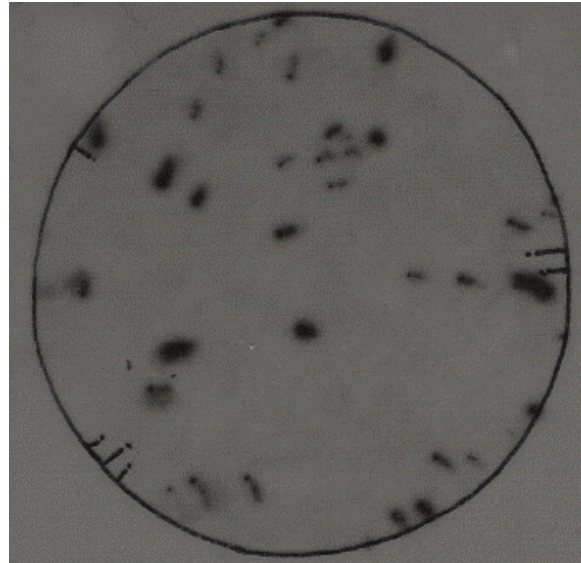


Nous avons ensuite ligué le vecteur pROSA26PA (AscI-PacI) avec la cassette « floxed NeopA-A1 » possédant aussi des extrémités AscI et PacI (Figure 28). Des bactéries ont été transformées par le produit de cette ligation et sélectionnées sur un milieu contenant de l'ampicilline. Plusieurs centaines de colonies Ap<sup>r</sup> ont été obtenues.

Afin d'identifier des clones contenant le plasmide voulu, nous avons criblé les colonies bactériennes Ap<sup>r</sup> par hybridation avec une sonde d'ADN radioactive spécifique de *MAGEA1* : le fragment PCR obtenu avec les primers A1S et A1AS sur de l'ADN de pCDNAIA1 (Figure 32 et 33).



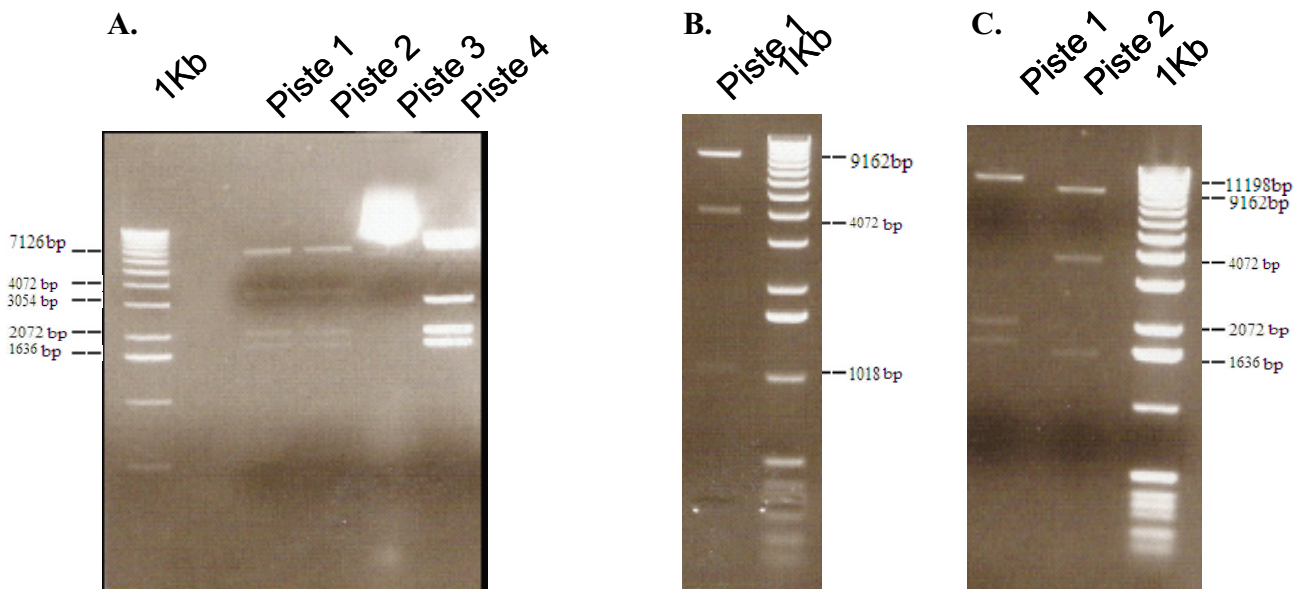
**Figure 32 :** Photographie après électrophorèse en gel d'agarose de la sonde synthétisée par PCR en utilisant les amorces A1-S et A1-AS et purifiée. Le poids moléculaire attendu est de 1 018bp. 1Kb= marqueur de poids moléculaire.



**Figure 33 :** Autoradiographie de la membrane hybridée par la sonde radioactive

Dans le but de vérifier que les spots de radioactivité observés après hybridation correspondent au plasmide pROSA26Neo-*AI* attendu, nous avons criblé par PCR certaines colonies bactériennes correspondant aux spots de radioactivité en utilisant une amorce sens située dans la cassette Neo (neolox1692) et une amorce anti-sens s'hybridant sur *MAGEA1* (A1-AS). Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose. La présence d'une bande de 2600 bp indiquait que les clones 5, 11 et 17 contiennent le plasmide voulu (données non montrées).

L'ADN plasmidique des clones 5, 11 et 17 a été préparé par lyse alcaline et digéré par *NheI*+*SacII*, *NheI*+*NotI*, *PacI*+*SacII*, *AscI*+*NheI*, *AscI*+*NheI* et par *EcoRI*, *Sall*, *SacII*, *AgeI* et *NcoI*. (Figure 34). Le poids moléculaire des fragments obtenus correspondait aux PM attendus ce qui a confirmé que ces clones contiennent bien le plasmide attendu. Comme dernière vérification, nous avons séquencé différentes parties du plasmide à l'aide des amorces ROSAS, ROSAAS, NeoF, NeoR, A1I, A1S, A1AS, bGH-AS, R et F. Les séquences obtenues par ce séquençage confirment que ces clones contiennent bien le plasmide attendu. Dans la suite des manipulations, seul le plasmide pROSA26Neo-*AI*-5 a été retenu.

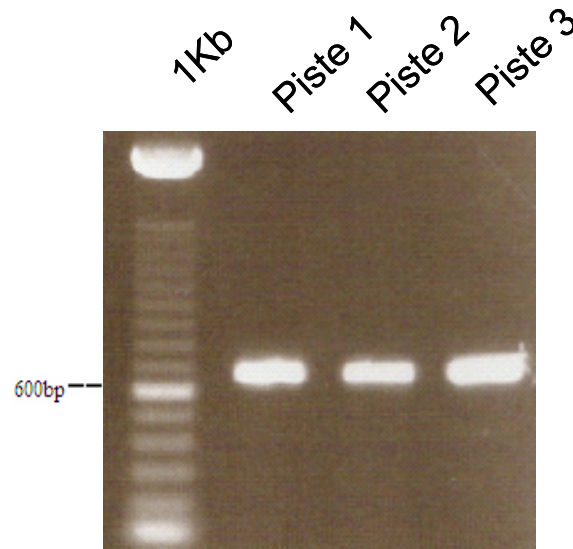


**Figure 34 :** Photographie après électrophorèse en gel d'agarose du profil de restriction obtenu par les doubles digestions : (A) piste 1 et 2 : *NheI*-*SacII* respectivement sur les clones 5 et 17 *NotI* (attendu 7046 bp, 3986 bp, 2009 bp et 1724 bp). Piste 4 : *NheI*+*NotI* (attendu 7046 bp, 3986 bp, 2009 bp et 1724 bp), la piste 3 correspond à pROSA26Neo-*AI* non clivé. (B) piste 1 : *PacI*+*SacII* (attendu 1080 bp, 4630 bp et 9054 bp), (C) piste 1 : *AscI*+*NheI* (attendu 2027 bp, 1706 bp et 11 038 bp), piste 2 *NheI*+*NdeI* (attendu 3733 bp, 1592 bp, 9440 bp).

### II.3. Test de recombinaison des sites LoxP

Afin de vérifier la fonctionnalité des sites LoxP dans la construction, des bactéries compétentes contenant p705Cre, un plasmide d'expression de Cre, ont été préparées et transformées par pROSA26Neo-*AI*. Le promoteur Cre dans p705Cre est activable à 37°C et l'origine de réplication de ce plasmide est thermosensible de sorte qu'il ne se réplique pas à 37°C. Les transformants ont été cultivés à 37°C soit en présence d'ampicilline, soit en présence d'ampicilline et de kanamycine. Si la recombinaison a bien eu lieu, les transformants

devaient devenir sensibles à la kanamycine (Kan<sup>r</sup>). C'est en effet ce que nous avons observé. Afin de vérifier que la séquence floxée a bien été excisée, une PCR a été effectuée sur les colonies résistant à l'ampicilline mais sensibles à la kanamycine. Les amorces choisies pour cette PCR s'hybrident de part et d'autre de la cassette « floxed NeopA ». Il s'agit de l'oligo ROSA-S s'hybridant sur le petit bras d'homologie en 5' et de l'oligo A1-I s'hybridant sur l'autre brin en aval du deuxième site LoxP. La présence d'une bande de 700 bp indique que la délétion de la cassette « floxed NeopA » a bien eu lieu (Figure 35).

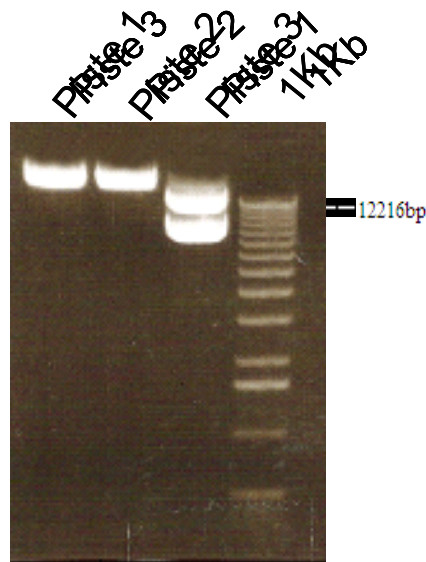


**Figure 35 :** Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose des produits de PCR obtenus par les oligos ROSAS et A1I après transformation des bactéries électrocompétentes contenant p705 Cre par pROSA26Neo-A1 et activation du promoteur Cre à 37°C. Le fragment attendu était de 700bp. 100bp = marqueur de poids moléculaire.

## II.4. Obtention de cellules ES exprimant *MAGEA1* de manière conditionnelle

### II.4.1. Transformation des cellules ES

Des cellules ES de la lignée E14 ont été électroporées par pROSA26Neo-A1 linéarisé par KpnI (Figure 36). Après transformation, les cellules ES transfectées ont été sélectionnées en présence de généticine et des colonies sont apparues après une semaine de sélection.



**Figure 36 :** Photographie sous UV après linéarisation de pROSA26Neo-*A1* par KpnI. Les pistes n°1 et 2 correspondent à pROSA26Neo-A1 linéarisé par KpnI. La piste n°3 correspond à pROSA26Neo-A1 non linéarisé.

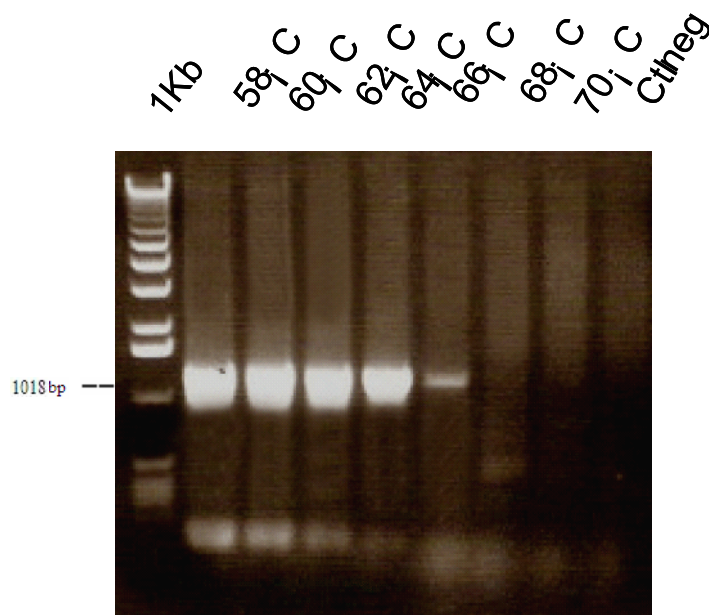
Deux cents colonies ont été repiquées et divisées en deux cultures. La première culture a été congelée tandis que la seconde a été lysée pour en extraire l'ADN et réaliser le criblage des recombinants.

A priori, il doit exister deux sortes de transfectants  $\text{Neo}^r$ , ceux où l'ADN de la construction pourrait s'être inséré de manière aléatoire et ceux où le vecteur s'est intégré par recombinaison homologue. Les clones qui nous intéressent sont ceux qui ont subi une double recombinaison homologue avec pour conséquence le remplacement du matériel chromosomique contenu entre les deux bras d'homologie par le matériel inséré entre les deux bras du vecteur : la cassette « floxed NeopA-*A1* ». Nous avons recherché ces recombinants par PCR en utilisant un oligo « sens » spécifique du locus mais absent du vecteur (MROSAS) et un oligo « anti-sens » spécifique de notre vecteur (BigA1AS) s'hybridant sur la séquence acceptrice de splicing SA (Figure 37). Aucun des clones testés ne s'est révélé positif pour cette PCR.





**Figure 38 :** Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose des produits de PCR obtenus avec les oligos A1S et A1AS sur l'ADN génomique des cellules ES transfectées. Le contrôle positif correspond à la même PCR mais effectuée que pcDNAIA1. Pour le contrôle négatif, de l'eau a été utilisée en lieu et place de l'ADN.



**Figure 39 :** Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose des produits de PCR obtenus par les oligos BigA1AS et F sur pROSA26NeopA-A1. Le fragment attendu était de 1130 bp. Pour le contrôle négatif, de l'eau a été utilisée en lieu et place de l'ADN. 1Kb=marqueur de poids moléculaire.

L'oligo MROSAS s'hybridant de manière spécifique avec le locus a ensuite été testé par PCR sur l'ADN génomique de souris. Nous avons décidé de tenter d'amplifier le petit bras d'homologie dans l'ADN génomique de souris. Pour ce, nous avons réalisé une PCR avec l'oligo MROSAS spécifique du locus dans l'ADN génomique de souris et AD2AS s'hybridant en « anti-sens » sur le petit bras d'homologie. Le fragment attendu était de 1Kb. Aucune amplification n'a été observée, ce qui suggère que notre méthode de criblage n'était pas fonctionnelle. Nous ne pouvons donc rien conclure quant à l'insertion de la construction dans l'ADN génomique.

### III. Discussion et perspectives

Le premier gène *MAGE* fut découvert en 1991. Depuis, de nombreux gènes de cette famille ont pu être identifiés chez l'homme et la souris. Ceux-ci ont été classés en deux catégories : les gènes *MAGE* de type I et de type II. Les gènes *MAGE* de type I constituent la majorité des gènes *MAGE*. Parmi ceux-ci, *MAGEA1* est exprimé spécifiquement dans les testicules et dans certaines cellules tumorales. L'expression de *MAGEA1* dans les tumeurs semble causée par des événements de déméthylation du génome qui se produisent lors du processus de transformation tumorale. Cette expression pourrait donc n'être qu'un épiphénomène. Cependant, il est tentant d'imaginer que l'expression de *MAGEA1* dans les tumeurs confère à celles-ci des propriétés favorisant leur transformation.

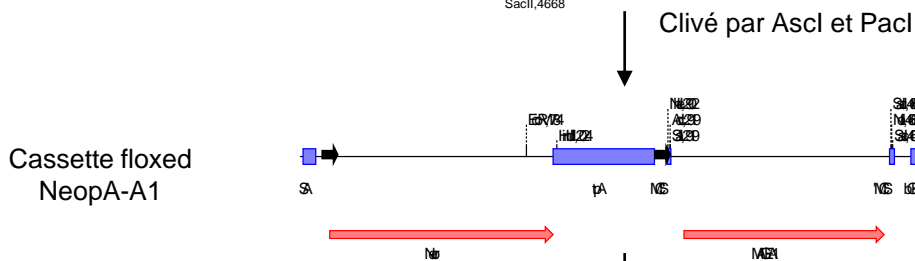
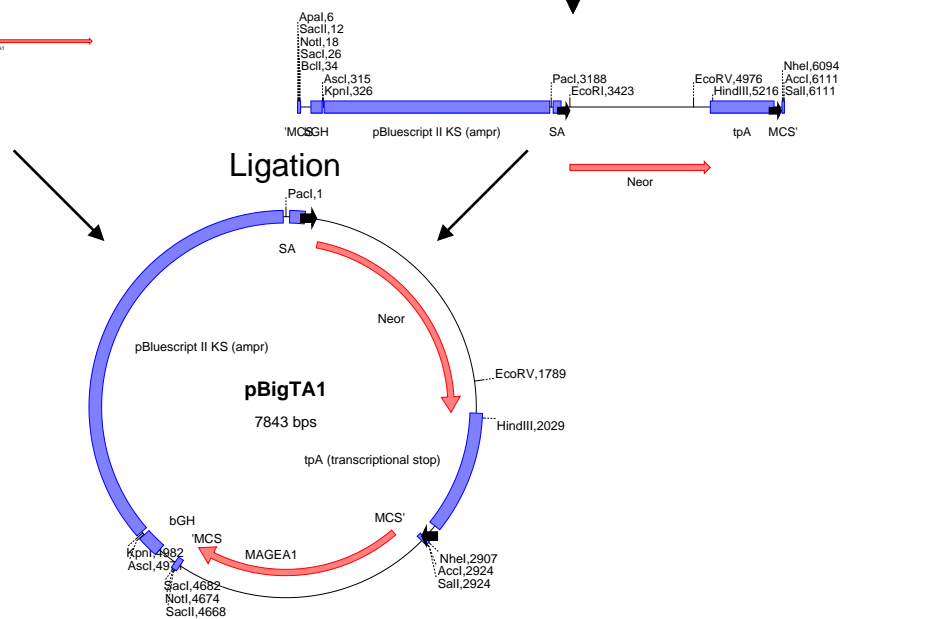
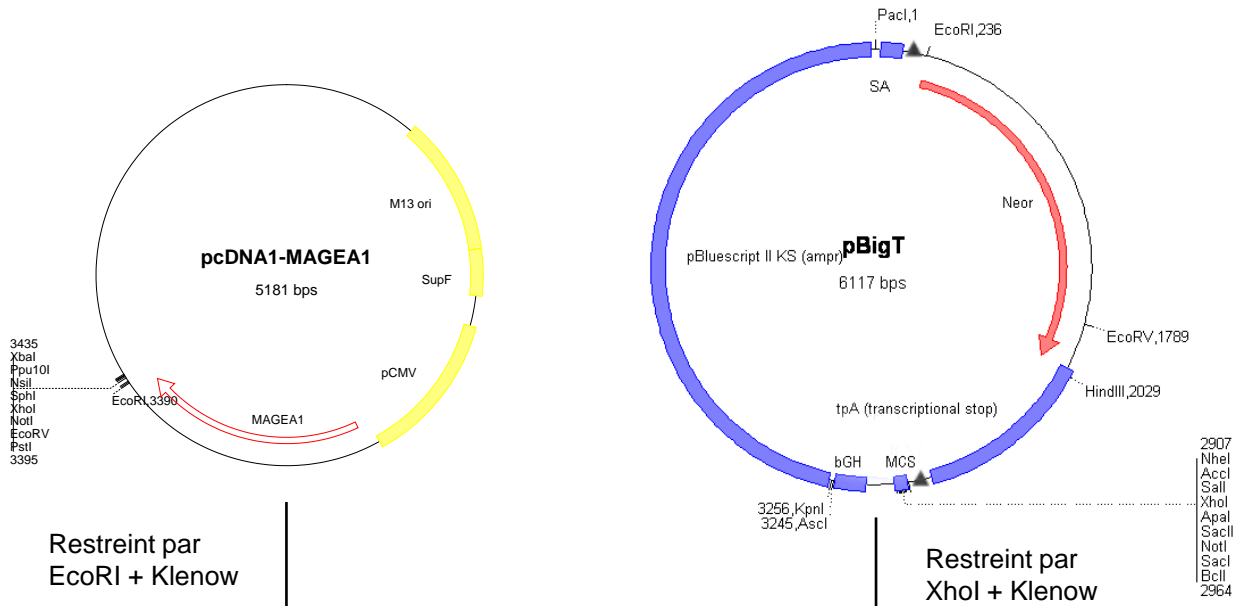
Nous avons donc décidé de tester l'hypothèse selon laquelle *MAGEA1* serait un oncogène. Des fibroblastes embryonnaires murins seront alors transformés avec *MAGEA1* et

la formation éventuelle de « foci » dans les cellules transfectées sera évaluée. Ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'un projet visant à analyser les effets de l'expression ectopique de *MAGEA1* in vivo, dans des souris transgéniques exprimant *MAGEA1* de manière conditionnelle. Le croisement de cette lignée avec différentes lignées de souris transgéniques Cre devrait permettre d'exprimer *MAGEA1* dans différents tissus dans lesquels l'apparition éventuelle de tumeurs sera étudiée. Outre ces perspectives très orientées, ce modèle permettra d'évaluer in vivo les conséquences de l'expression de *MAGEA1* dont la fonction est à ce jour encore peu connue. Dans ce but, nous avons élaboré un vecteur d'expression conditionnelle de *MAGEA1* activable par le système Cre/lox et introduit ce vecteur dans des cellules souches embryonnaires de souris.

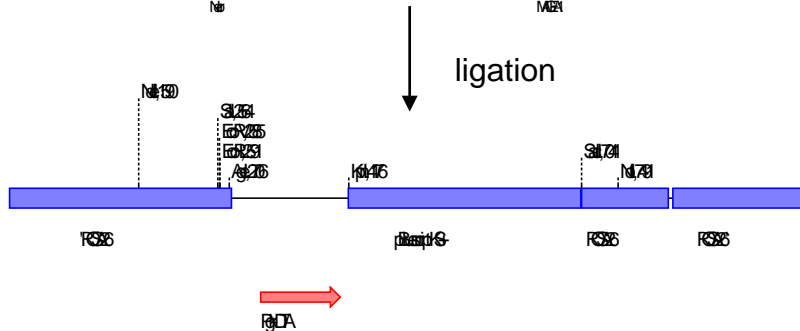
Utiliser le système Cre/Lox pour activer de manière conditionnelle la transcription de *MAGEA1* impliquait l'insertion de ce gène derrière un terminateur transcriptionnel flanqué de deux sites LoxP. Nous avons ensuite choisi d'introduire le transgène dans un locus comportant un promoteur « ubiquiste », le locus ROSA26, entre deux bras d'homologie permettant la double recombinaison homologue. Lorsque notre vecteur fut construit, nous l'avons introduit dans des cellules souches embryonnaires.

Après transformation, les cellules ES ont été sélectionnées en présence de généticine et des colonies sont apparues après une semaine de sélection. Deux cents clones ont été repiqués et après extraction de l'ADN, nous avons cherché les recombinants par PCR. Aucun des deux cents clones testés ne s'est avéré positif pour cette PCR. Après différents tests, nous avons réalisé que la technique de criblage utilisée n'était peut être pas fonctionnelle. Afin contourner ce problème, nous allons réaliser le criblage des transformants par Southern blot plutôt que par PCR.

Si le criblage par Southern blot s'avère positif, une série de vérifications seront effectuées. Nous vérifierons par Southern blot qu'aucun réarrangement important du locus n'a eu lieu et qu'aucune copie supplémentaire du vecteur n'est intégrée ailleurs dans le génome. Le caryotype des cellules ES sera aussi analysé. Ces vérifications faites, les cellules ES seront soit injectées dans des blastocystes de souris sauvages soit agrégées avec des morules au stade 8-16 cellules. Les embryons seront réimplantés dans l'utérus de mères porteuses et les souris chimériques seront croisées avec des femelles sauvages de manière à vérifier que le transgène est transmis à la descendance. Les animaux transgéniques seront finalement croisés avec des souris transgéniques Cre en vue d'obtenir des souris hétérozygotes pour l'expression conditionnelle de *MAGEA1*.



pROSA26PA  
clivé par AscI et PacI





# Bibliographie

1. Abremski, K., Wierbicki, A., Frommer, B. & Hoess, R.  
Bacteriophage P1 Cre-loxP Site-specific Recombination  
*J. Biol. Chem* **261**, 391-396 (1986)
2. Akagi, K., Sandig, V., Vooijs, M., Ven der Valk, M., Giovannini, M., Strauss, M. & Berns, A.  
Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice  
*Nucleic Acids Res.***25** (9), 1766-1773 (1997).
3. Andrieu, D., Watrin, F., Niinobe, M., Yoshikawa, K., Muscatelli, F. & Fernandez, P-A.  
Expression of the Prader-Willi gene *Necdin* during mouse nervous system development correlates with neuronal differentiation and p75NTR expression  
*Gene Expr Patterns* **3**, 761-765
4. Antequera, F., Boyes, J. & Bird, A.  
High levels of de novo méthylation and altered chromatin structure at CpG island in cell lines.  
*Cell* **62**, 503-514 (1990)
5. Baylin, S., Herman, J.G., Graff, J.R., Vertino, P.M. & Issa, J.P.  
Alterations in DNA méthylation: a fundamental aspect of neoplasia.  
*Cancer Res* **72**, 141-196 (1998)
6. Bird, A.  
DNA méthylation patterns and epigenetic memory.  
*Genes Dev* **16**, 6-21 (2002)
7. Barker P.A, Salehi, A.  
The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease.  
*J Neurosci Res.* **67**,705-712 (2002)
8. Bertrand, M., Huijbers, I., Chomez, P., De Backer, O.  
Comparative expression analysis of the MAGED genes during embryogenesis and brain development.  
*Dev Dyn* **230**, 325-334 (2004)
9. Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., De Plaen, E., Boon, T. & Lucas, S.  
An overview of the MAGE family with the identification of all human members of the family.  
*Cancer Res* **61**, 5544-5551 (2001).
10. Clotman, F., De Backer, O., De Plaen, E., Boon, T. & Picard, J.  
Cell- and stage specific expression of Mage genes during mouse spermatogenesis  
*Mamm Genome* **11**, 696-699 (2000)
11. De Backer, O., Verheyden, A. M., Martin, B., Godelaine, D., De Plaen, E., Brasseur, R., Avner, P. & Bonn, T.  
Structure, chromosomal location, and expression pattern of three mouse genes homologous to the human MAGE genes

*Genomics* **28**, 74-83 (1995)

12. De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J.J., Szikora, J.P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C., & al.  
Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family.  
*Immunogenetics* **40**, 360-9 (1994)
13. De Plaen, E., De Backer, O., Arnaud, D., Bonjean, B., Chomez, P., Martelange, V., Avner, P., Baldacci, P., Babinet, C., Hwang, S-Y, Knowles, B. & Boon, T.  
A New Family of Mouse Genes Homologous to the Human MAGE Genes.  
*Genomics* **55**, 176-184 (1999)
14. De Smet, C., Courtois, S.J., Faraoni, I., Lurquin, C., Szikora, J.P., De Backer, O. & Boon, T.  
Involvement of Ets binding sites in the transcriptional activation of the MAGE1 gene.  
*Immunogenetics* **42**, 282-290 (1995)
15. De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F. & Boon, T.  
The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7149-7153 (1996).
16. De Smet, C., Lurquin, C., Lethe, B., Martelange, V., and Boon, T.  
DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter.  
*Mol Cell Biol* **19**, 7327-35 (1999)
17. De Smet, C., Loriot, A. & Boon, T.  
Promoter-Dependent Mechanism Leading to Selective Hypomethylation within the 5' Region of Gene MAGE-A1 in Tumor Cells.  
*Mol Cell Biol* **24**(11), 4781-4790 (2004)
18. Dechant, G. & Barde, Y-A.  
The neurotrophin receptor p75NTR : novel functions and implications for diseases of the nervous system  
*Nature* **5**(11), 1131-1135 (2002)
19. Feinberg, A.P. & Tycko, B.  
The history of cancer epigenetics  
*Nat. Rev. Cancer* **4**, 143-153 (2004)
20. Ferguson-Smith, A.C. & Surani, M.A.  
Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes.  
*Science* **293**, 1086-1089 (2001)
21. Gu, C., Casaccia-Bonnel, P., Srinivasan, A. & Chao, M. V.  
Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation  
*J Neurosci* **19**, 3043-3049 (1999)
22. Hoess, R.H., Abremski, K.

Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1026-1029 (1984)

23. Jordan, B.W., Dinev, D., LeMellay, V., Troppmair, J., Gotz, R., Wixler, L., Sendtner, M., Ludwig, S. & Rapp, U.R.  
Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inductible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death.  
*J Biol Chem* **276**, 39985-9 (2001).
24. Jurk, M., Kremmer, E., Schwarz, U., Forster, R., Winnacker, E.L.  
MAGE-11 protein is highly conserved in higher organisms and located predominantly in the nucleus  
*Int J Cancer* **75**(5), 762-766 (1998)
25. Kafri, T., Ariel, M., Brandeis, M., Shemer, R., Urven, L., McCarrey, J., Cedar, H. & Razin, A.  
Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line.  
*Genes Dev* **6**, 705-714 (1992)
26. Laduron, S., Deplus, R., Zhou, S., Kholmanskikh, O., Godelaine, D., De Smet, C., Hayward, S.D., Fuks, F., Boon, T. & De Plaen E.  
MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription.  
*Nucleic Acids Res.* **32** (14), 4340-4350 (2004).
27. Lucas, S., Brasseur, F., & Boon, T.  
A new MAGE gene with ubiquitous expression does not code for known MAGE antigens recognized by T Cells.  
*Cancer Research* **59**, 4100-4103 (1999).
28. MacDonald, H.R. & Wevrick, R.  
The necdin gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse.  
*Hum Mol Genet* **6**, 1873-1878 (1997)
29. Macleod, D., Ali, Robin, R. & Bird, A.  
An alternative promoter in the mouse major histocompatibility complex class II I-A<sub>g</sub> gene: implications for the origin of CpG islands.  
*Mol Cell Biol.* **18**, 4433-4443 (1998)
30. Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J. & Bird, A.P.  
Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island.  
*Gene Dev* **8**, 2282-2292
31. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M. H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bourlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P. Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager,

- E., De greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P. G., van der bruggen, P. & Boon, T.  
Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1  
*Int J Cancer* **80**, 219-230 (1999)
32. Masuda, Y., Sasaki, A., Shibuya, H., Ueno, N., Ikeda, K., and Watanabe, K.  
Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function.  
*J Biol Chem* **276**:5331-8 (2001).
33. Matsuda, T., Suzuki, H., Oishi, I., Kani, S., Kuroda, Y., Komori, T., Sasaki, A., Watanabe, K. & Minami, Y.  
The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with the melanoma-associated antigen (MAGE) family protein Dlxin-1 and regulates its intracellular distribution.  
*J Biol Chem* **278**, 29057-29064 (2003)
34. Monk, M., Boubelik, M. & Lehnert, S.  
Temporal and regional changes in DNA méthylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse emryo development.  
*Development* **99**, 371-382 (1987)
35. Muscatelli, F., Abrous, D.N., Massacrier, A., Boccaccio, I., Le Moal, M., Cau, P., & Cremer, H.  
Disruption of the mouse *Necdin* gene results in hypothalamic and behavioural alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome.  
*Hum Mol Genet* **9**, 3101-3110 (2000)
36. Nagao, T., Higashitsuji, H., Nonoguchi, K., Sakurai, T., Dawson, S., Mayer, R.J., Itoh, K., and Fujita, J.  
MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity.  
*J Biol Chem* **278**, 10668-74 (2003).
37. Nagy, A.  
Cre recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring  
*Genesis* **26**, 99-109 (2000)
38. Panthier, J.J., Montagutelli, X. & Guénet, J-L  
La génétique de la souris  
Belin, Paris (2003)
39. Riggs, A.D. & Pfeifer G.P.  
X-chromosome inactivation and cell memory.  
*Trends Genet* **8**, 169-174 (1992)
40. Rimoldi, D., Salvi, S., Reed, D., Coulie, P., Jongeneel, VC., De Plaen, E., Brasseur, F., Rodriguez, AM., Boon, T. & Cerottini, JC.  
cDNA and protein chraracterization of human MAGE-10  
*Int J Cancer* **82**(6), 901-907 (1999)

41. Roux, P.P. & Barker P.A.  
Neurotrophin signaling through p75 neurotrophin receptor  
*Prog Neurobiol* **67**, 203-233 (2002)
42. Saburi, S., Nadano, D., Akama, T.O., Hirama, K., Yamanouchi, K., Naito, K., Tojo, H., Tachi, C. & Fukuda M.N.  
The Trophinin Gene Encodes a Novel Group of MAGE Proteins, Magphinins, and Regulates Cell Proliferation during Gametogenesis in the Mouse.  
*J.Biol. Chem* **28**, 4938-49389 (2001)
43. Sakurai, T., Itoh, K., Higashitsuji, H., Nagao, T., Nonoguchi, K., Chiba, T.& Fujita, J.  
A Cleaved Form of MAGE-A4 Binds to Miz-1 and Induces Apoptosis in Human Cells  
*J.Biol.Chem* **279**, 15505-15514 (2004)
44. Saheli, A. H., Roux, P. P., Kubu, C. J., Zeindler, C., Bhakar, A., Tannis, L. L., Verdi, J. M. & Barker, P. A.  
NRAGE, a novel protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis  
*Neuron* **27**, 279-288 (2000)
45. Salehi AH, Xanthoudakis, S., Barker, A.  
NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway.  
*J Biol Chem.* **277**, 48043-54800 (2002)
46. Sasaki, A., Masuda, Y., Iwai, K., Ikeda, K. & Watanabe, K.  
A ring finger protein praj1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for teh Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin Family protein, Dlxin-1  
*J Biol Chem* **277**, 22541-22546 (2002)
47. Soriano, P.  
Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain.  
*Nat Genet* **21**, 70-71 (1999)
48. Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C.S., William, CM., Tanabe, Y., Jessell, T.M.& Costantini, F.  
Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus  
*BMC Dev Biol* **1**:4(2001)
49. Takahashi, K., Shichijo, S., Noguchi, M., Hirohata, M. & Itoh, K.  
Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis  
*Cancer Res* **55**, 3378-3382 (1995)
50. Taniura, H., Taniguchi, N., Hara, M. & Yoshikawa, K.  
Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1

*J Biol Chem* **277**, 49101-49104 (1998)

51. Taniura, H., Matsumoto, K. and Yoshikawa, K.  
Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor necdin with p53.  
*J Biol Chem* **274**, 16242-8(1999).
52. Taniura, H., Taniguchi, N., Hara, M., and Yoshikawa, K.  
Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1.  
*J Biol Chem* **273**, 720-8(1998).
53. Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von der Driesch, P., Brocker, E. B., Steinman, R. M., Enk, A., Kampgen, E. & Schuler, G.  
Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma  
*J Exp Med* **190**, 1669-1678 (1999)
54. Uetsuki, T., Takagi, K., Sugiura, H. & Yoshikawa, K.  
Structure and Expression of the Mouse Necdin Gene  
*J. Biol. Chem* **271**(2), 918-924
55. Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., Boon, T.  
A Gene Encoding an antigen Recognized by Cytolytic T Lymphocytes on a Human Melanoma  
*Science*, **254**(5038), 1643-1647 (1991)
56. Van der Bruggen, P., Zhang, Yi., Chaux, P., Stroobant, V., Panichelli, C., Schultz, S.E., Chapiro, J., Van den Eynde, B.J., Brasseur, F. & Boon, T.  
Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells  
*Immunological Rev* **188**, 51-64 (2002)
57. Vozianov, Y., Pathania, S. & Jayaram, M.  
A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases  
*Nucleic Acids Res* **27**(4), 930-941(1999)
58. Williams, M.E., Strickland, P., Watanabe, K. and Hinck, L.  
UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE.  
*J Biol Chem* **278**, 17483-90 (2003).
59. Xiao, J., Chen, H.S.  
Biological functions of melanoma-associated antigens.  
*World J Gastroenterol* **10**(13), 1849-1853 (2004)
60. Yoon, S.O., Cassaccia-Bonnet, P., Carter, B. & Chao, M.  
Competitive Signaling Between TrkA and p75 Nerve Growth Factor Receptor Determines Cell Survival



*J Neurosci* **18**(9), 3273-3281 (1998)

61. Yoshikawa, K.

Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons

*Neurosci Res* **37**, 1-14 (2000)